

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ**  
**“Київський політехнічний інститут ім. Ігоря Сікорського”**

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра екобіотехнології та біоенергетики

**ДИПЛОМНИЙ ПРОЕКТ**

рівня вищої освіти «бакалавр»  
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»  
за освітньо-професійною програмою «Екологічна біотехнологія та  
біоенергетика»

на тему: «Біотехнологія одержання пептидів з відходів рибної  
промисловості»

Студента групи БЕ-61  
(номер групи)

Демків Анастасії Романівни  
(ПІБ студента)

Керівник проекту к.т.н., асист. Левтун І.І.  
(науковий ступінь, вчене звання, ПІБ керівника)

Проект захищено з оцінкою \_\_\_\_\_

Дата захисту \_\_\_\_\_

Київ 2020

## ВІДОМІСТЬ ДИПЛОМНОГО ПРОЕКТУ

№ з/п	Ф о р м а т	Позначення	Найменування	К і л ь к і с т ь л и с т і в	Примітка
1	A4		Завдання на дипломний проект	2	
2	A4	ЕКБ.БЕ6127.ДП	Пояснювальна записка	132	
3	A1	ЕКБ.БЕ6127.ТС	Технологічна схема	1	
4	A1	ЕКБ.БЕ6127.АС	Апаратурна схема	1	
5	A1	ЕКБ.БЕ-6127.20680-2002.000.ВО	Ферментер	1	
				ЕКБ.БЕ6127.ДП	
		ПІБ	Підп. Дата		
Розробн.	Демків А.Р.			Відомість дипломного проекту	Лист Листів
Керівн.	Левтун І.І.				1 132
Н/контр.					«КПІ ім. Ігоря Сікорського» Каф.КЕБ Гр. БЕ-61
Зав.каф.	Кузьмінський С.В.				

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ  
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ  
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»**

**Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра екобіотехнології та біоенергетики**

До захисту допущено:  
Завідувач кафедри  
\_\_\_\_\_ Євгеній КУЗЬМІНСЬКИЙ  
(підпис)

«\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2020р.

**Дипломний проект**

**на здобуття ступеня бакалавра**

**за освітньо-професійною програмою «Екологічна біотехнологія та  
біоенергетика»**

**спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»**

**на тему: «Біотехнологія одержання пептидів з відходів рибної  
промисловості»**

Виконала:  
студентка IV курсу, групи БЕ-61  
Демків Анастасія Романівна

\_\_\_\_\_

Керівник:  
асист., к.т.н.  
Левтун Ігор Ігорович

\_\_\_\_\_

Рецензент:  
Проф., д.б.н.  
Горчаков Володимир Юрійович

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Засвідчую, що у цьому дипломному  
проекті немає запозичень з праць інших  
авторів без відповідних посилань.

Студентка \_\_\_\_\_

Київ – 2020 року

**Національний технічний університет України**

**«Київський політехнічний інститут  
імені Ігоря Сікорського»**

Факультет біотехнології і біотехніки  
Кафедра екобіотехнології та біоенергетики

Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Екологічна біотехнологія та біоенергетика»

**ЗАТВЕРДЖУЮ**  
Завідувач кафедри

**Євгеній КУЗЬМІНСЬКИЙ**  
(підпис) (ім'я , прізвище)

«\_\_\_»\_\_\_\_\_2020р.

**ЗАВДАННЯ**  
**на дипломний проект студенту**  
**Демків Анастасії Романівні**

1. Тема проекту «Біотехнологія одержання пептидів з відходів рибної промисловості»

керівник проекту: к.т.н., асист. Левтун І.І.

затверджені наказом по університету від «\_\_\_\_\_» 20\_\_ р. №\_\_\_\_\_

2. Термін подання студентом проекту \_\_\_\_\_

3. Вихідні дані до проекту: розробити технологію отримання пептидів білкових гідролізатів для виробництва 835 тонн продукту на рік при безперервному режимі роботи підприємства.

4. Зміст пояснювальної записки: дослідити склад та властивості вихідної рибної сировини, ознайомитись з різними методами отримання пептидів, риб'ячого гідролізату, включаючи різні види гідролізів, ізоелектричну солюбілізацію та осадження, та їх вплив на функціональні властивості білка, обрати технологію отримання пептидів та обґрунтувати її вибір, при цьому дана технологія має відповідати стандартам та новітнім досягненням науки і техніки. Необхідно навести вимоги до підготовки виробництва, вказати

оптимальні режими етапів виробничого процесу, розрахувати матеріальний баланс процесу, навести і описати технологічну схему виробництва продукту, обґрунтувати вибір основного обладнання і розрахувати його основні технологічні параметри. Також необхідно обрати допоміжне обладнання, параметри контролю етапів процесу, необхідні для забезпечення якості кінцевої продукції, навести основи охорони праці і довкілля.

5. Перелік графічного матеріалу (із зазначенням обов'язкових креслеників, плакатів, презентацій тощо): технологічна схема (A1), апаратурна схема (A1), ферментер (A1).

6. Консультанти розділів проекту

7. Дата видачі завдання \_\_\_\_\_

## Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання дипломного проекту	Термін виконання етапів проекту	Примітка
1	Пошук літературних джерел		
2	Загальна характеристика пептидів та білкових гідролізатів, обґрунтування вибору сировини, біосинтез цільового продукту, обґрунтування вибору технології вилучення пептидів білкових гідролізатів, характеристика живильного середовища для подальшого культивування.	До 20.04.2020	
3	Характеристика обладнання. Описання та обґрунтування обраного ферментера. Огляд перебігу біохімічних процесів в ферментері. Характеристика кінцевого продукту.	До 1.05.2020	
4	Розрахунок матеріального балансу. Розрахунки обладнання	До 10.05.2020	
5	Розробка технологічної, апаратурної схеми, креслення ферментеру.	До 15.05.2020	
6	Написання п'ятого розділу, висновків	До 21.05.2020	
7	Охорона праці та довкілля.	До 25.05.2020	
8	Оформлення пояснювальної записки, графічної частини.	До 25.05.2020	

Студент \_\_\_\_\_ Анастасія Демків  
(підпис)

Керівник проекту \_\_\_\_\_ Ігор Левтун  
(підпис)

## РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка: 132 с., 23 рис., 2 табл., 81 посилання.

Розроблено проект біотехнологічного отримання пептидів шляхом ферментативного гідролізу сировини з відходів рибної промисловості за використання мікроорганізмів з метою виділення якісного продукту пептидів білкового гідролізату - кормової добавки. В проекті обґрунтовано вибір процесу безперервної ферментації біосировини з отриманням необхідного гідролізату, який відповідає новітнім досягненням науки і техніки. Вибрано вихідну сировину та біологічний агент, наведені вимоги до біосировини, запропоновано схема підготовки виробництва до ферментації, вказані оптимальні режими етапів виробничого процесу, розраховано матеріальний баланс процесу, наведена і описана технологічна схема виробництва пептидів білкових гідролізатів, обґрунтовано вибір основного обладнання (виробничого ферментера) і розраховано його основні технологічні параметри. Також обрано допоміжне обладнання, параметри контролю етапів процесу, необхідні для забезпечення якості кінцевої продукції, наведено основи охорони праці і довкілля.

ПЕПТИДИ, ПЕПТИДИ БІЛКОВИХ ГІДРОЛІЗАТІВ, БІОСИРОВИНА, БЕЗПЕРЕРВНА ФЕРМЕНТАЦІЯ, ТЕХНОЛОГІЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГІДРОЛІЗУ, МАТЕРІАЛЬНИЙ БАЛАНС, КОНТРОЛЬ.

## **ABSTRACT**

Explanatory note: 132 pages, 23 figures, 2 tables, 81 references.

The project of biotechnological production of peptides by enzymatic hydrolysis of raw materials from fish industry waste with the use of microorganisms in order to isolate a quality product obtained from protein hydrolyzate - peptides that are used as feed additives. The project substantiates the choice of the process of continuous fermentation of biological raw materials to obtain the required hydrolyzate, which corresponds to the latest advances in science and technology. The raw material and biological agent are selected, the requirements for bioraw materials are given, the scheme of preparation of production for fermentation is offered, the optimal modes of stages of production process are specified, the material balance of process is calculated, the technological scheme of production product obtained from protein hydrolyzate is described, basic technological parameters. Auxiliary equipment, control parameters of the stages of the process, necessary to ensure the quality of the final product, the basics of labor and environmental protection are also selected.

PEPTIDES, PEPTIDES OBTAINED FROM PROTEIN HYDROLYSATE, BIORAW MATERIALS, CONTINUOUS FERMENTATION, TECHNOLOGY OF ENZYMATIC HYDROLYSIS, CONTROL.



## ЗМІСТ

<b>ВСТУП.....</b>	<b>6</b>
<b>РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ, БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ</b>	
1.1. Загальна характеристика пептидів та білкових гідролізатів.....	14
1.1.1. Характеристика біоактивних пептидів та пептидних білкових гідролізатів.....	18
1.1.2. Застосування пептидів, отриманих з відходів рибної промисловості.....	23
1.1.3. Характеристика сировини.....	24
1.1.4. Обґрунтування вибору сировини.....	25
1.2. Біосинтез цільового продукту.....	27
1.2.1. Біохімія синтезу пептидів.....	38
1.2.2. Технології отримання пептидів з відходів рибної промисловості.....	57
1.2.3. Колоїдно-хімічні властивості білкових гідролізатів.....	58
1.2.4. Обґрунтування вибору технології вилучення пептидів білкових гідролізатів.....	63
1.3. Характеристика живильного середовища для подальшого культивування.....	66
1.3.1. Обґрунтування вибору складу поживного середовища для подальшого культивування.....	68

					ЕКБ.БЕ6127.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Зміст	Стадія	Арк.	Акрушів
Розроб.		Демків А.Р.						
Керів.		Левтун І.І.					7	132
Затверд.						КПІ ім. Ігоря Сікорського,ФБТ		

1.3.2. Характеристика біологічного агента.....	71
1.3.3. Обґрунтування вибору технології культивування.....	80
1.4. Характеристика обладнання.....	81
1.4.1. Описання та обґрунтування обраного ферментера.....	86
1.5. Висновки до розділу.....	87

## **РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ**

2.1. Схема перебігу процесів.....	89
2.2. Характеристика кінцевого продукту.....	89

## **РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА**

3.1. Сировина та матеріали.....	91
3.2. Опис технологічного процесу.....	104
3.3. Контроль виробництва.....	107
3.4. Матеріальний баланс.....	108

## **РОЗДІЛ 4. ВИБІР І ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЛАДНАННЯ**

4. 1. Розрахунок виробничої потужності.....	109
4.2. Технічна характеристика ферментера.....	110
4.3. Вихідні дані для розрахунку.....	110
4.4. Конструктивний розрахунок.....	112
4.5. Розрахунок барботера.....	114
4.6. Розрахунок перемішуючого пристрою.....	114

4.7. Розрахунок глибини воронки.....	115
4.8. Розрахунок потужності розділ.....	117
4.9. Розрахунок штуцерів.....	120
<b>РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ.....</b>	<b>123</b>
<b>ВИСНОВКИ.....</b>	<b>126</b>
<b>ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....</b>	<b>131</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>132</b>

## Перелік скорочень, умовних позначень, термінів

**Біотехнологія** – інтегроване використання біохімії, мікробіології та біоінженерії для промислової реалізації потенційних можливостей мікроорганізмів, культур клітин, тканин чи окремих їхніх частин.

**Біологічний агент** – мікроорганізми, віруси, клітини й тканини рослин, людини і тварин, їхні компоненти й позаклітинні речовини, використовувані в біологічних процесах.

**Культивування біологічних агентів** – цілеспрямоване вирощування біологічних агентів з використанням поживних середовищ.

**Поживне середовище** – набір хімічних сполук, що забезпечує життєдіяльність мікроорганізмів.

**Технологічний процес** – частина виробничого процесу з цілеспрямованими діями, щодо зміни та(або) визначення стану предмета праці.

**Державний стандарт України (ДСТУ)** — є національним стандартом, затвердженим Державним комітетом України по стандартизації, метрології і сертифікації (Держстандарт України).

**ТС** - технологічна схема.

**ДР** - допоміжні роботи

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						10
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## ВСТУП

**Постановка проблеми:** Відомо, що існуючі технології переробки відходів від оброблення риби спрямовані на отримання з них нутрієнтів: білків, ліпідів, вуглеводів, мінеральних і біологічно-активних речовин, не завжди здатні забезпечити безвідходність процесу при збереженні високої якості одержуваних продуктів [1]. Це обумовлено або неповним виділенням нутрієнтів з сировини при його обробці в сприятливих умовах (під дією слабо концентрованих розчинів кислот, лугів, ПАР або ферментів), або денатурацією і погіршенням якості нутрієнтів при дії концентрованих кислот, лугів, розчинників і високих температур [1,2]. Внаслідок чого неминуче забруднення навколишнього середовища екстрагують агентами і великими обсягами промивних вод.

Реальний обсяг української рибної продукції, який потрапляє на продовольчий ринок країни, може становити близько: 135 000 - 180 000 тонн, це те, що країна виловлює сама. В 2019 році українськими компаніями-імпортерами було ввезено 394 000 тонн риби [1, 2]. При цьому постійно зростає кількість рибних відходів, які йдуть на звалище і при цьому втрачаються всі цінні продукти, які можна отримати з них. Отримання пептидів та колагенових концентратів з відходів від оброблення є актуальним напрямком розробки, так як це дозволяє знизити екологічне навантаження, утилізувати невикористовувані вторинні ресурси і отримати цінні продукти з високою вартістю [1].

Крім мотивації позбутися від харчових відходів, для компаній існує також мотивація отримання додаткового доходу, оскільки в відходи йде від 20 до 70% маси виловленої риби; випуск продукції з вторинних продуктів означає зниження витрат на основний продукт [1];

					ЕКБ.БЕ6127.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Вступ	Стадія	Арк.	Акрушіє
Розроб.		Демків А.Р.						
							11	132
Керів.		Левтун І.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського,ФБТ		
Затверд.								

використання відходів «в справу» призводить до зниження вартості риби, тому що витрати на сировину залишаються незмінні. Раціональне використання рибної сировини знімає ряд проблем екологічного плану, усуває витрати на утилізацію [1].

**Актуальність даної теми** обумовлена неповноцінним використанням відходів рибопереробних виробництв, що є поширеною проблемою рибної галузі [1]. Щодня в процесі переробки рибних ресурсів виробляються тонни відходів при виробництві рибного філе, фаршу, консервів та інших видів рибної продукції. Риба і рибні продукти є важливим компонентом в харчовому раціоні, а для населення ряду країн - основним продуктом харчування [1]. Необхідність вирішення проблеми комплексного використання водних ресурсів очевидна, це не тільки знизить витрати на виробництво традиційних видів рибної продукції, а й дозволить помітно розширити асортимент [1].

**Метою дипломного проекту** є розгляд технологій переробки відходів рибної промисловості з отриманням продуктів, що матимуть пряме використання у галузях промисловості. В даному випадку - це пептиди білкових гідролізатів, що мають пряме використання як кормова добавка у різних галузях, основною з яких є харчова промисловість. Мета обумовлена тим, що в даний час у світі існує дві важливих, з точки зору біотехнології, проблеми: дефіцит білкових продуктів тваринного походження, придатних до використання в різних секторах промисловості та проблема поводження з відходами, а саме рибного виробництва та некондиційною рибною сировиною. Існує необхідність вирішити ці дві проблеми найбільш вигідним способом.

**Для досягнення поставлених цілей необхідно вирішити наступні питання:** дослідити склад та властивості вихідної рибної сировини, ознайомитись з різними методами отримання пептидів, риб'ячого гідролізату, включаючи різні види гідролізів, ізоелектричну солюбілізацію та осадження, та їх вплив на функціональні властивості білка, обрати технологію отримання пептидів та обґрунтувати її вибір, при цьому дана технологія має відповідати

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						12
ЗМН.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

стандартам та новітнім досягненням науки і техніки. Необхідно навести вимоги до підготовки виробництва, вказати оптимальні режими етапів виробничого процесу, розрахувати матеріальний баланс процесу, навести і описати технологічну схему виробництва продукту, обґрунтувати вибір основного обладнання і розрахувати його основні технологічні параметри. Також необхідно обрати допоміжне обладнання, параметри контролю етапів процесу, необхідні для забезпечення якості кінцевої продукції, навести основи охорони праці і довкілля.

**Об'єкт дослідження.** Процес культивування мікроорганізмів для отримання пептидів білкових гідролізатів.

**Предмет дослідження.** Технологія процесу культивування мікроорганізмів за використання ферментера.

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						13
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

# РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА СИРОВИНИ, БІОЛОГІЧНОГО АГЕНТА. ОБГРУНТУВАННЯ ТЕХНОЛОГІЇ

## 1.1. Загальна характеристика пептидів та білкових гідролізатів

### 1.1.1. Характеристика біоактивних пептидів та пептидних білкових гідролізатів

#### *Пептидні білкові гідролізати*

Все частіше рибопереробні галузі в усьому світі обмежені, оскільки вони переповнені великою кількістю побічних продуктів переробки риби [1]. У викиди часто потрапляють цілісні компоненти риби, хоча вони представляють можливості для відновлення як довгих, так і коротких пептидів, амінокислот, спільно званих гідролізатами [2].

Білкові продукти, одержувані з відходів гідробіонтів можна розділити на наступні групи: білковий гідролізат (білкові концентрати, білкові ізоляти), мінеральні компоненти (преципітати), і ліпіди [1].

Рідкі білкові продукти можна умовно розділити на концентрати, гідролізати і ізоляти [2]. Якщо ступінь розщеплення (гідролізу) білкових молекул, що виражається у відношенні амінного азоту до загального, перевищує 40%, то білковий препарат можна вважати гідролізатом [2]. Білкові ізоляти отримують з розчинів білкових концентратів шляхом знежирення останніх і осадження мікрофібрилярної фракції білків в ізоточці при рН 4-5 [2].

Білковий гідролізат - це продукт з високим вмістом вільних амінокислот і поліпептидів [2]. Процес білкового гідролізу ініціюється і протікає під дією каталізують речовин, які руйнують в білкової молекулі структурний зв'язок C-N. На рис.1 показано як відбувається руйнування зв'язку в молекулі трипептиду [1].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 1. Характеристика сировини, біологічного агента. Обґрунтування технології.	Стадія	Арк.	Акрушів
Розроб.		Демків А.Р.						
							14	132
Керів.		Левтун І.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського,ФБТ		
Затверд.								



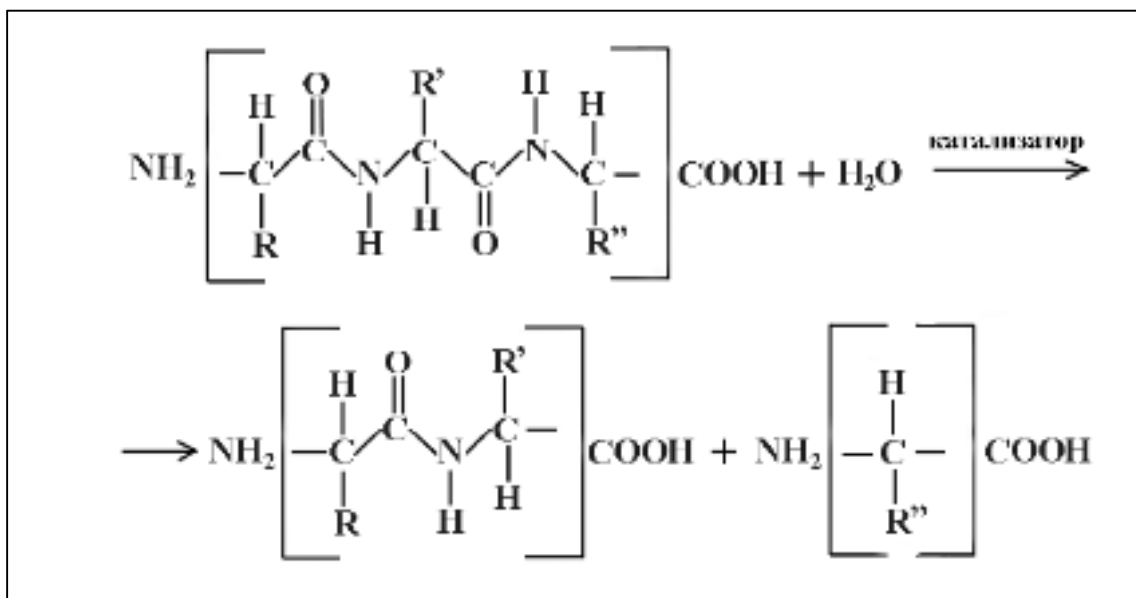


Рис.1.1. Руйнування зв'язку C-N в молекулі трипептиду [2].

### Біоактивні пептиди

Біоактивні пептиди - це специфічні білкові фрагменти, отримані з рослинних або тваринних джерел, які мають корисні речовини для харчування та позитивно впливають на здоров'я [2].

Біоактивні пептиди є неактивними у своїй батьківській послідовності білка, але можуть вивільнятися ферментативним гідролізом; однак для ефективного використання біоактивні пептиди повинні досягати цільового органу або рецепторів у просвіті кишечника неушкодженими і повинні переживати ферментативну деградацію [2].

Глибока переробка білкової сировини, що передбачає розщеплення білкових молекул до складових мономерів є найбільш важливим процесом при виробництві біологічно активних речовин [3]. Перспективним в цьому відношенні є гідроліз білкового сировини з метою виробництва білкових гідролізатів для отримання цінних біологічно активних сполук: поліпептидів і вільних амінокислот [3].

Багато біологічно активних пептидів природного походження відрізняються структурно від пептидів, що утворюються в результаті процесингу білків [1]. Найчастіше в їхньому складі перебувають небілкові амінокислоти, такі, як / 3-аланін, 7-аміномасляна кислота, D-амінокислоти та ін. Для багатьох низькомолекулярних пептидів також характерні ш-пептидні зв'язку і кільцеві структури [1]. Такі структурні особливості, а також залишки піроглутамінової кислоти утворюють дієвий захист проти атаки протеаз, що володіють зазвичай субстратної специфічністю до пептидів з про-амінокислот з нормальними пептидними зв'язками [2]. Пептиди, природні або синтетичні, молекули яких брало побудовані із залишків α-амінокислот, з'єднаних між собою пептидними (амідних) зв'язками C(O)NH. Можуть містити в молекулі також не амінокислотну компоненту (напр., Залишок вуглеводу) [2]. За кількістю амінокислотних залишків, що входять в молекули пептидів, розрізняють ді-пептиди, трипептиди, тетрапептиди і т.д. Пептиди, що містять до 10 амінокислотних залишків, називаються олігопептидами, що містять більше 10 амінокислотних залишків [1].

Історична довідка. Вперше пептиди були виділені з ферментативних гідролізатів білків. Термін "пептиди" запропонований Е. Фішером [3]. Перший синтетичний пептид отримав Т. Курціус в 1881 Е. Фішер до 1905 розробив перший загальний метод синтезу пептидів і синтезував ряд олигопептидов разл. будови [3]. Істотний внесок в розвиток хімії пептидів внесли учні Е. Фішера Е. Абдергальден, Г. Лейку і М. Бергман [3]. У 1932 році М.Бергман і Л.Зервас використовували в синтезі пептидів бензілоксікарбонільную групу (карбобензоксігрупу) для захисту α-аміногруп амінокислот, що ознаменувало новий етап у розвитку синтезу пептидів [3]. Отримані N-захищені амінокислоти (N-карбобензоксіамінокислоти) широко використовували для отримання різних пептидів, які успішно застосовували для вивчення ряду ключових проблем хімії та біохімії, наприклад, для дослідження субстратної специфічності протеолітична. ферментів [1]. Із застосуванням N-карбобензоксіамінокислот були вперше синтезовані природні пептиди (глутатіон, карнозин і ін.) [1].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						16
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Важливе досягнення в цій галузі розроблений на початку 50-х рр. Р. Вогану і інші. Синтез пептидів методом змішаних ангідридів (детально методи синтезу пептидів розглянуті нижче) [1]. У 1953 В. Дю Віньо синтезував перший пептидний гормон -окситоцин. На основі розробленої Р. Мерріфілд в 1963 році концепції твердофазного пептидного синтезу були створені автоматичним. синтезатори пептидів [1]. Отримали інтенсивний розвиток методи контрольованого ферментативного синтезу пептидів. Використання нових методів дозволило здійснити синтез гормону інсуліну та інші [1].

Успіхи синтетичні. хімії пептидів були підготовлені досягненнями в області розробки таких методів розділення, очищення та аналізу пептидів, як іонообмінна хроматографія, електрофорез на разл. носіях, гель-фільтрація, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), імуно-хімічний аналіз і інші [3]. Отримали великий розвиток також методи аналізу кінцевих груп і методи ступеневої розщеплення пептидів. Були, зокрема, створені автоматичним. амінокислотні аналізатори та автоматичним. прилади для визначення первинної структури пептидів-секвенатори [1, 3].

### **1.1.2. Застосування пептидів, отриманих з відходів рибної промисловості**

#### *Застосування в промисловості*

Білок, отриманий методом ферментативного гідролізу, може бути широко затребуваний в харчовій, медичній та кормовій промисловості, завдяки повноцінному амінокислотним складом, змістом в них макро- і мікроелементів, жирних кислот, в тому числі поліненасичених жирних кислот, а також завдяки доступності технології переробки [1].

В даний час серед широкого спектру гідролітичних ферментів найбільше практичне значення мають протеази, пептидази, ліпази і амілази [3]. Ферментативний гідроліз білків (протеоліз) лежить в основі регуляції важливих фізіологічних процесів (перетравлювання білкових компонентів їжі, синтез ферментів і гормонів, формування імунної відповіді, секреція) на різних рівнях

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						17
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

організації живих систем [3]. Перебіг даного процесу забезпечується великою кількістю протеолітичних ферментів (протеаз), що функціонують як всередині, так і поза клітинами [3]. Області використання протеолітичних ферментів різноманітні.

Морська риба забезпечує багате джерело біоактивних сполук, таких як білки та пептиди [1]. Біоактивні білки та пептиди, отримані з морської риби, викликають величезний інтерес у харчовій, фармацевтичній та косметичній промисловості завдяки їх широкому спектру біоактивності, антиоксидантний, антимікробний та антивіковий дії [1]. Останнім часом, зростає інтерес до розробки косметичних препаратів, що використовують білки морських риб та пептиди, отримані за допомогою хімічного або ензиматичного гідролізу побічних продуктів переробки риби швидко зростає завдяки їх діяльності. Морський рибний використовують колаген для розробки косметичних препаратів завдяки його властивостям відновлення шкіри та тканинної регенерації [1,3].

З метою підвищення ефективності використання сировини, що переробляється розроблена технологія комплексного ферментного препарату з залишків від переробки гідробіонтів [4]. До складу його входять трипсин, хімотрипсин, карбоксипептидаза А, амілаза, нуклеази і тд. Препарат ефективний як в стартові і товарні рибні корми, а також при очищенні щупалець і мантиї кальмара від шкіри [3].

Поліпшенню смакових та ароматичних властивостей продукції сприяє добавка «Крабова» з відходів від оброблення креветок, краба і криля. Її рекомендується використовувати при виробництві супів, концентратів, холодних закусок [4].

*Антиоксидантний потенціал та імуномодуюча дія*

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						18
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

В даний час пептиди гідробіонтів привертають увагу дослідників завдяки своїм антиоксидантним, антиканцерогенним, імуномодулюючим і іншим біологічно активним властивостям [4].

Досліджувані гідробіонти, як джерела біологічно активних сполук, представлені різними типами, класами, видами та підвидами морських організмів [4]. Це можуть бути медузи, риби (Морський окунь, сом, камбала), морські їжаки, морські гриби і актиноміцети [9]. вивчення механізмів і особливостей їх імунітету, що забезпечують антибактеріальну, протівірусну, протипаразитарну захист, дозволяє вступити в область абсолютно нових уявлень і отримати інноваційні хімічні сполуки (молекули) [4].

В дослідженні Кательникової [9] показано, що пептиди, отримані з гідролізатів білків морських організмів, наприклад, мідій, морського вугра, мікроводоростей, морських їжаків, виступають в якості потенційних антиоксидантів [10,11]. Антиоксидантна активність біологічно активних пептидів пов'язана з наявністю в їх складі гідрофобних амінокислот, деяких ароматичних амінокислот і гістидину [9].

Желатинові пептиди багаті гідрофобними амінокислотами, і велика кількість цих амінокислот сприяє їх високій активності [11, 12]. Причому морські желатинові пептиди володіють більш вираженими антиоксидантними властивості, ніж пептиди, отримані з інших білків, через високий відсоток вмісту гліцину і проліну [12]. Антимікробні пептиди гідробіонтів розглядаються в даний час в якості головних факторів системи їх вродженого імунітету і представляють собою першу ланку захисту від патогенів [14].

Серед виділених з морських організмів пептидів [14] знайдено 35 нових сполук з антимікробною активністю. Було досліджено, що сцифоїдні медузи *Aurelia aurita* містять антимікробний пептид аурелін (Молекулярна маса 4297 Да), що складається з 22 амінокислот і пригнічує ріст і розмноження деяких грам позитивних та грам бактерій [14].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						19
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Особливий інтерес також представляє вивчення комплексу біологічно активних речовин з морських їжаків, оскільки в них міститься широкий набір пептидів [15].

Пептид хрізопсін-1 з червоного пагра *Chrysophrys major* проявляє широкоспектральну протимікробну, а також протизапальну активність шляхом пригнічення макрофагів TNF- $\alpha$  в клітинній лінії RAW264 [15]. Імуномодуюча активність властива антимікробному пептиду паразіну I, отриманого з гистона слизу шкіри сома [16]. Циклічні і лінійний пептиди, виділені з тунікат (покривників), мають протипухлинну, протівірусну і імунодепресивну дію [16];

Відповідно до недавніх досліджень *in vitro* пептиди з гідробіонтів за рахунок індукції апоптозу здатні пригнічувати патологічну проліферацію клітин бронхів різного калібру [17].

Широкий спектр пептидів, що володіють антиоксидантними властивостями, виділений з морських організмів [5]. Наприклад, показано, що гідролізат риби фугу має сильну антиоксидантну дію [5]. Встановлено, що пептидні фракції гідролізату м'язових білків лососів інгібують окислення лінолевої кислоти [8]. Гідролізат м'язової тканини камбали також має сильну антиоксидантну дію *in vitro* [7]. Октапептид, виділений з пептидного гідролізату плавників лосося, має антиоксидантну дію [8]. Антиоксидантна активність виявлена в пептидах гонад морського їжака, шкіри кальмара, нутрощів ставриди, м'язової тканини трепанга, шкіри минтая [7].

Передбачається, що саме за рахунок наявності високого кількості компонентів пептидної природи різні гідробіонти проявляють специфічну біологічну активність [10]: зниження рівня холестерину, гепатопротекторний ефект, антиканцерогенні властивості. Варто також відзначити, що за даними більшості літературних джерел, біологічно активні властивості найбільшою мірою виявляють пептиди з молекулярною масою від 1 до 10 кДа [10].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						20
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Біологічно активні речовини з морських гідробіонтів можуть стати основою для створення нових лікарських препаратів для профілактики і лікування вірусних респіраторних інфекцій та їх ускладнень [7].

Фармакологічна активність і вираженість ефекту препарату на основі глікопептидів залежить також від технології його отримання [18]. Наприклад, встановлено, що спосіб екстракції травного тракту і некондиційної ікри зелених морських їжаків (*S. droebachiensis*) шляхом рідинної екстракції деіонізованою водою і органічними розчинниками (етанол, ізопропанол) дозволяє підвищити антиоксидантну дію отриманих продуктів в порівнянні з методом класичної мацерації [18].

На етапі вивчення пептидів, отриманих з гідробіонтів (аурелін, епінесідін-1, хрізопсін-1, паразін I, аспертеррестід), вдалося довести їх антимікробну, протизапальну, імуномодулюючу, протівірусну і протипухлинну дію [18].

#### *Роль в біоремедіації*

Останніми роками спостерігається постійне зростання експлуатації енергетичних ресурсів, і орієнтовна кількість, що використовується для споживання людиною (105,6 млн. Т), становить 75% світового світового виробництва [18]. Решта (25% улову, що дорівнює приблизно 34,8 млн. тонн) вважаються відходами (FAO 2007) [17]. Крім того, комерційна, переробна промисловість виробляє великі кількості відходів та стічних вод. Тверді відходи після переробки риби, що становлять 20–60% від вихідної сировини, містять різні види залишків (цілі відходи, ш, голова, внутрішні органи, шкіра, кістки, кров, рак печінки, статеві залози, кишки, частина м'язової тканини тощо) [19]. У деяких країнах ці викиди не використовуються, а спалюються або скидаються в море, що спричиняє екологічні проблеми [17]. Останнім часом екологічні норми стають суворішими, вимагаючи нових методів утилізації, заснованих на тому, що відходи від риби та гідробіонтів в цілому можуть розглядатися як важливе

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						21
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

джерело поліпептидів, амінокислот, ліпідів та мінералів з високою біологічною цінністю [19].

### *Вплив на організм*

Численні результати досліджень пов'язують користь для здоров'я з гідролізатами рибного білка (ГРБ) разом із їх корисними харчовими якостями [18]. Гідролізати продемонстрували відчутний ефект проти серцево-судинних захворювань, раку, діабетиків та старіння [18]. Гідролізати є хорошими джерелами білків для людей, які мають проблеми з перетравленням білка, і вони також можуть використовуватися у фармацевтичній та харчовій промисловості, виходячи з їх біоактивності та функціональності [19].

### **1.1.3. Характеристика сировини.**

В якості сировини для виробництва білкових гідролігатів можуть бути використані будь-які повноцінні за амінокислотним складом природні білки, джерелами яких можуть бути кров і її складові компоненти; тканини і органи тварин і рослин [20, 22]; відходи молочної та харчової промисловості; ветеринарні конфіскати; харчові та малоцінні в харчовому відношенні продукти, одержувані при переробці різних видів тварин, птиці, риби; відходи виробництва м'ясокомбінатів і клейових заводів і ін. [20].

Сировиною можуть бути будь-які відходи рибопереробки [19]. У дослідженнях з проблеми недовикористання водних ресурсів, відходами прийнято називати кінцевий продукт, який не має подальшого використання. Все те, що підлягає подальшій переробці, є сировиною [19].

Переробка комерційного рибного промислу призводить до викиду до 50% сировини, що складається з луски, раковин, рамок, хребтів, внутрішніх органів, голови, печінки, шкіри, клаптів живота, темних м'язів тощо [19, 20]. Викиди риб та молюсків також призводять до значної кількості продукту, що не має комерційної цінності через погану привабливість для споживачів. Швидке

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						22
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



гниття рибних відходів має серйозний негативний вплив на навколишнє середовище, що потребує виправних заходів [20].

Також, рибні відходи є перспективними джерелами пептидів та ферментів, таких як протеази, ліпази, гідролази, хітинази, лужні фосфатази, трансклутамінази, гіалуронідази, ацетилглікозамінідази [21]. Наприклад, голови і кістки досить доцільно переробляти за наявною технологією виробництва рибного борошна, в той час, як м'які тканини і внутрішні органи, що містять цінні ліпідну і білкову фракції, залишаються вкрай недовикористаними [21].

Відходи від оброблення, зокрема кісткові відходи від оброблення риб, мають високий вміст мінеральних речовин, в тому числі кальцію, магнію що свідчить про їх високу біологічну цінність [20].

В чисельних дослідженнях було встановлено, що у відходах від розбирання гідробіонтів міститься велика кількість цінних біологічних речовин (кальцій, магній, фосфор, колаген, пролін) [21]. Як об'єкт отримання БАР на основі пептидів перспективні відходи форелі і скумбрії. В якості сировини для отримання мінеральних преципітатів придатні кісткові відходи форелі, тріски, скумбрії [21]. В якості сировини для отримання білкових концентратів придатні відходи як риб, так і ракоподібних. В якості сировини для отримання полісахариду хітину і хітин-мінерального комплексу найбільш перспективні відходи креветки і гаммаруса [21, 22].

Ферменти риб та молюсків можуть мати різноманітне застосування в промисловості морепродуктів, які охоплюють виділення та модифікацію білків, виробництво біоактивних пептидів, прискорення традиційного бродіння, лущення та видалення молюсків, масштабування морських риб, видобуток ароматизаторів, продовження терміну придатності, модифікація текстури, усунення неприємних запахів, а також для контролю якості безпосередньо або як компонентів біосенсорів [21, 22].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						23
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Для ефективного використання сировини, фракції, які отримують при обробленні риби, необхідно розділити, причому максимально зберігаючи якість і вихід обох [1, 21].

#### 1.1.4. Обґрунтування вибору сировини.

В якості досліджуваної сировини доцільно розглядати відходи переробки основних видів промислової риби, таких як скумбрія, лосось, тріска й оселедець. Середній вміст білка у представників цих видів 18-24%, вміст жиру до 30% (у тріски до 1%) [22]. .

Більшість існуючих технологій отримання харчових добавок і БАД з кісток і хрящів гідробіонтів спрямовані на отримання одного або декількох специфічних компонентів, що містяться в хрящових відходах риб [21]. Головним чином це хондроїтинсульфат, мукополісахариди, продукти гідролізу колагену, біологічний кальцій. Для отримання чистих препаратів цих речовин використовуються дорогі методи хроматографії [21]. Більшість технологій переробки направлено на проведення екстракції сировини, з метою виділити протеїнові складові зі шкіри, кісток та інших компонентів відходів гідробіонтів [21, 22]. .

Як хімічні агенти, що використовуються для екстракції застосовуються: водні розчини хлориду натрію, лугів, карбонату натрію, хлорводневої кислоти, фосфорної кислоти, а також різні органічні розчинники, такі як спирти і інші [22]. .

*Сировина для описуваного процесу складається з білкового матеріалу, переважно риб, рибопродуктів, молюсків, ракоподібних і побічних продуктів рибної чи риболовецької промисловості, наприклад відходів та інших водних організмів, що мешкають як в прісній, так і в солоній воді. Різні види сировини можуть використовуватися окремо або у вигляді комбінації продуктів, що містять «ферментний матеріал» і «білковий матеріал». «Ферментний матеріал» є*

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						24
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

сировина, що містить ендogenous ферменти в достатній кількості і задовільної якості [22]. «Білковий матеріал» є сировина, що не містить ендogenous ферментів задовільної якості в достатній кількості і яке внаслідок цього має бути доповнене ферментним продуктом для того, щоб забезпечити проведення ферментної обробки [22]. У деяких випадках ферментний матеріал може бути ідентичний білкового матеріалу. Сировина відповідає встановленим вимогам, що пред'являються до вихідних речовин для отримання харчових продуктів [22]. Раніше сировину класифікували відповідно до законодавства і термінологією як відходи [21]. Завдяки хорошій логістиці і технічних програм в даному випадку сировина може бути визнано харчовим продуктом. Це дозволяє здійснювати виробництво в промисловому масштабі і використовувати продукт в харчовій і / або фармацевтичної промисловості [21, 22].

#### *Попередня обробка сировини [22]:*

Сировина прокачується з резервуара через дробильну систему, яка забезпечує бажане подрібнення матеріалів. Дроблення забезпечує велику робочу поверхню для ферментів і більш швидке виділення сировинних ферментів.

Перша система масло / жир може виділятися з сировини до початку процесу ферментації. В даному випадку, наприклад, може використовуватися холодна регенерація масла [22].

#### *Холодна регенерація масла включає наступні стадії [22]:*

1. Центрифугування сировини і розділення рідких і твердих частинок на дві різні фракції;
2. Виділення масла з рідкої фази;
3. Змішування твердої фази і важкої фази зі стадії поділу і перекачування суміші в ферментер;

4. Додаткову обробку масляної фази зі стадії поділу з утворенням готового, прийняттого для споживача продукту, що не потребує додаткової очистки для придбання якості харчового продукту.

Сировина, доданий в ферментер, може зберігатися в одній або декількох буферних ємностях після розмелювання. Для білкового і ферментного матеріалів можуть використовуватися різні ємності [22].

Матеріали можна перекачувати через теплообмінник в бродильний чан. Бродильний чан також може використовуватися для нагрівання, якщо така операція не проводиться в теплообміннику до перекачування матеріалів [21, 22].

Контроль умов в ферментере здійснюють безперервно, автоматично. Введення добавок здійснюють таким чином, що підтримуються якомога більше стабільні умови ферментації в рамках інтервалів значень, які є оптимальними для виробленого продукту [22].

## 1.2. Біосинтез цільового продукту

### 1.2.1. Біохімія синтезу пептидів

Біосинтез пептидів полягає в створенні пептидного зв'язку між групою  $\text{COOH}$  однієї амінокислоти і  $\text{NH}_2$  іншої амінокислоти або пептиду. Відповідно до цього розрізняють карбоксильну і амінну компоненти реакції пептидного синтезу [23]. Для проведення цілеспрямованого контрольованого синтезу пептидів необхідна передуватиме тимчасовий захист усіх (або деяких) функціональних груп, які не беруть участі в утворенні пептидного зв'язку, а також передуватиме активація однієї з компонент пептидного синтезу [21]. Після закінчення синтезу захисні групи видаляють. При отриманні біологічно активних пептидів необхідна умова - запобігання рацемізації амінокислот на всіх етапах пептидного синтезу [23].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						26
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Всі захисні групи ділять на N-захисні (для тимчасового захисту групи  $\text{NH}_2$ ), C-захисні (для тимчасового захисту карбоксильних груп  $\text{COOH}$ ) і R-захисні (для тимчасового захисту іншої функціональної групи в бічному ланцюзі амінокислот  $\text{H}_2\text{NCH(R)COOH}$ ) [23].

Серед N-захисних груп найб. важливими є ацил-ні захисні групи [в т.ч. типу  $\text{ROC(O)}$ ], а також алкільні і аралкільні захисні групи [24]. Приклади N-захисних груп типу  $\text{ROC(O)}$ -бензілоксикарбонільна група (карбобензоксигрупа)  $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{OCO}$  і трет-бутоксикарбонільна група  $(\text{CH}_3)_3\text{COCO}$  [24]. До ацильного N-захистів-ним групам відносять: формільную  $\text{HCO}$ , трифторацетилову  $\text{CF}_3\text{CO}$  і ін. Представники N-захисних груп алкільної і аралкільної природи - триметилсілільна  $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$  і трифенілметильна (трітильна)  $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{C}$  [24].

Серед C-захисних груп найважливішими є складно-ефірні і заміщені гідразидних групи. До перших відносять, наприклад, метокси, етокси- і трет-бутоксигрупи. Захисні групи гідразидного типу - бензілоксикарбоніл-, трет-бутилоксикарбоніл-, тритіл- і феніл-гідразиди [24].

Як R-захисних груп широко використовують ацильні групи, в т.ч. типу  $\text{ROC(O)}$  (для захисту аміногруп і гуанідіногруп в бічних ланцюгах лізину і аргініну відповідно) [24]. Складноефірні угруповання (для захисту карбоксилу в бічних ланцюгах аспарагінової і глутамінової к-т), а також алкільні і аралкільні групи (для захисту груп  $\text{OH}$  і  $\text{SH}$  в бічних ланцюгах гідроксиамінокислоти і цистеїну соотв.) [24].

Поряд із зазначеними угрупованнями, для захисту аміно-, гуанідіно- і карбоксигруп в молекулах вихідних амінокислот або пептидів широко використовують реакції солеутворення [25]. Розроблено також спеціальні прийоми тимчасового захисту при синтезі пептидів тіоефірної фракції метіоніну,

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						27
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ними-дазольного кільця гістидину, амідних груп в бокових ланцюгах аспарагіну і глутаміну, а також індольного кільця триптофану [25].

Найбільш важливі способи утворення пептидного зв'язку при здійсненні реакції в р-ре-методи активують ефіри, карбодіімідний, змішаних ангідридів і азидний метод [25].

Метод активованих ефірів заснований на освіті складноефірного похідного карбоксильної компоненти шляхом введення в неї спиртового залишку, що містить сильний електроноакцепторний заступник [24]. В результаті утворюється високореакційноздатні ефіри, легко піддається амінолізу під дією амінокомпоненти пептидного синтезу. Як активир. ефірів при синтезі пептидів широко використовують Пента-фтор-, пентахлор-, трихлор- і п-нітрофенілові і ряд ін. ефірів захищених амінокислот і пептидів [24, 25].

Карбодіамідний метод утворення пептидного зв'язку передбачає використання в якості конденсують реагенти різних заміщених карбодіамідів. Особливо широке застосування при синтезі пептидів отримав дициклогексил-карбодіамід [25]:

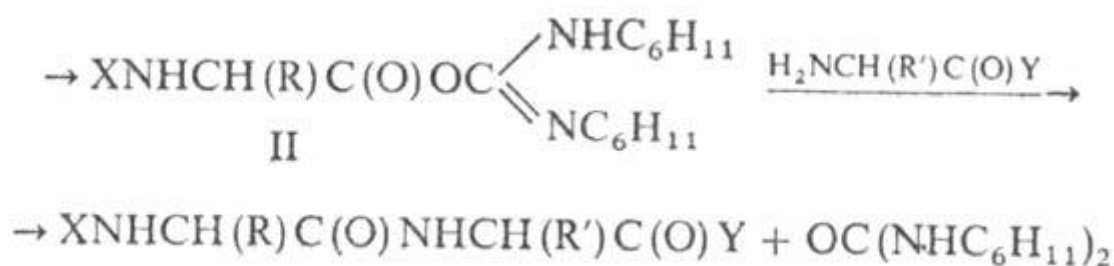


Рис. 1.1. Карбодіамідне утворення пептидного зв'язку [25].

Х і Y-соотв. N- і C-захисні групи С цим конденсується реагентом можна здійснювати синтез пептидів і в водних середовищах, т. К. Швидкості реакційгідролізу і амінолізу проміжно утворюється О-ацілізомо-чевіни (II) істотно розрізняються [24]. При синтезі пептидів знаходять також застосування різні водорозчинні карбодіаміди (напр., N-диметиламінопропіл-N'-етілкарбодіімід) [25].

Метод змішаних ангідридів заснований на активації карбоксильної компоненти пептидного синтезу шляхом утворення змішаного ангідриду з карбонової або неорганічної кислоти. Найбільш часто використовують алкілові ефіри хлормуравьиной (хлоругольной) кислоти, особливо етиловий та ізобутиловий ефіри, наприклад [25]:

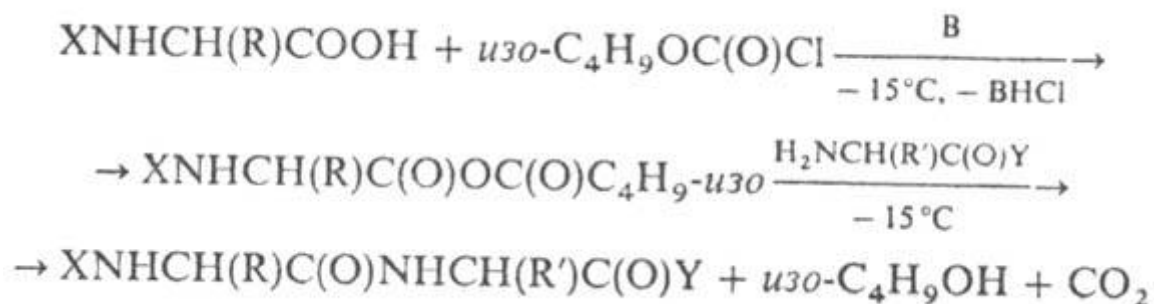


Рис. 1.2. Активація карбоксильної компоненти пептидного синтезу шляхом утворення змішаного ангідриду з карбонової або неорганічної кислоти [25].

де - В - третинний амін

При синтезі пептидів за цим методом досить ефективні змішані ангідриди N-аціламінокіслот і півалінової (триметилуксусный) к-ти. Завдяки сильному індуктивному ефекту трет-бутилової групи електрофільність карбоксильного атома С в залишку півалінової к-ти істотно знижена, і це, поряд зі наступаючими перешкодами, пригнічує небажану побічну реакцію утворення уретану і N-аціламінокіслоти, здійснюється за схемою [25]:

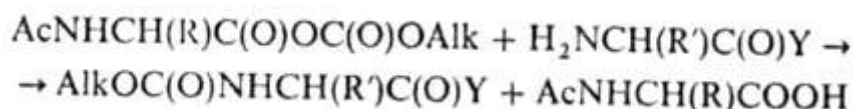


Рис. 1.3. Побічна реакція утворення уретану і N-аціламінокіслоти [25].

В одному з варіантів методу змішаних ангідридів застосовують як конденсуючого агента 1-етоксікар-Бонілья-2-метокси-1,2-дегідрохолін. Це сполуки [25]. легко утворює з карбоксильної компонентою пептидного синтезу проміжний змішаний ангідрид, швидко вступає в реакцію конденсації, причому повністю виключається небажана побічна реакція [25].

Окремий випадок методу змішаних ангідридів - метод симетричних ангідридів, в якому використовують ангідрид швидко вступає в реакцію конденсації, причому повністю виключається небажана побічна реакція [25].

Окремий випадок методу змішаних ангідридів - метод симетрич. ангідридів, в якому використовують ангідриди амінокислот  $[XNHCH(R)C(O)]_2O$  [25]. Їх застосування виключає можливість диспропорціонування або неправильного амінолізу [25].

Білковий гідролізат - це продукт з високим вмістом вільних амінокислот і поліпептидів. Процес білкового гідролізу ініціюється і протікає під дією каталізують речовин, які руйнують в білковій молекулі структурний зв'язок C-N. На рис.1 показано як відбувається руйнування зв'язку в молекулі трипептиду [25].

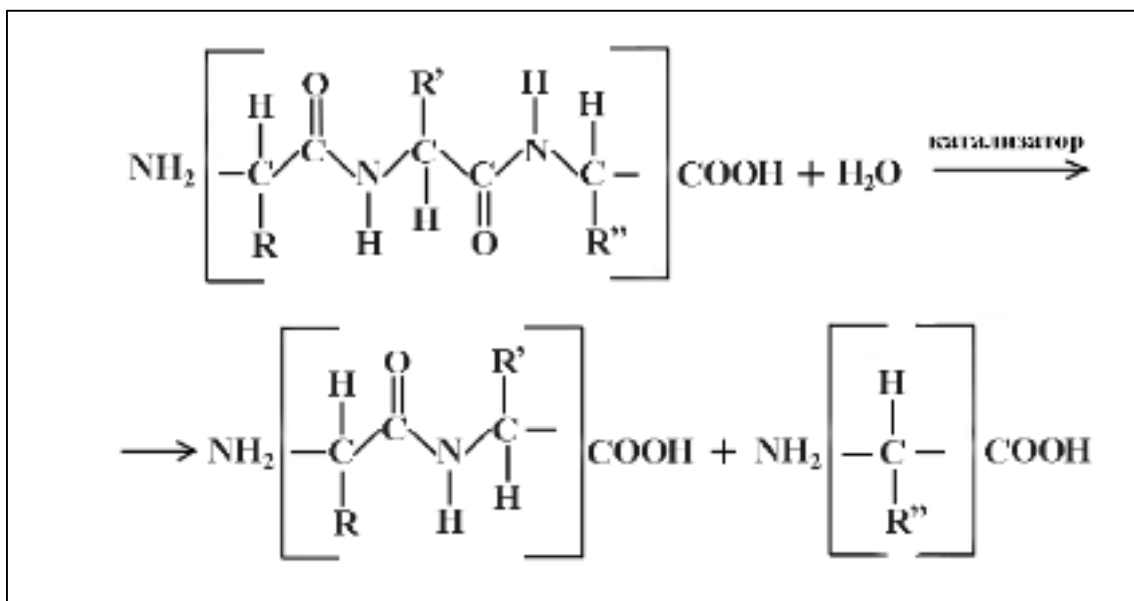


Рис.1.4. Руйнування зв'язку C-N в молекулі трипептиду

Азідний метод синтезу передбачає активацію карбоксильної компоненти передуватиме, перетворенням її в азид N-заміщений амінокислоти або пептиду [25]:



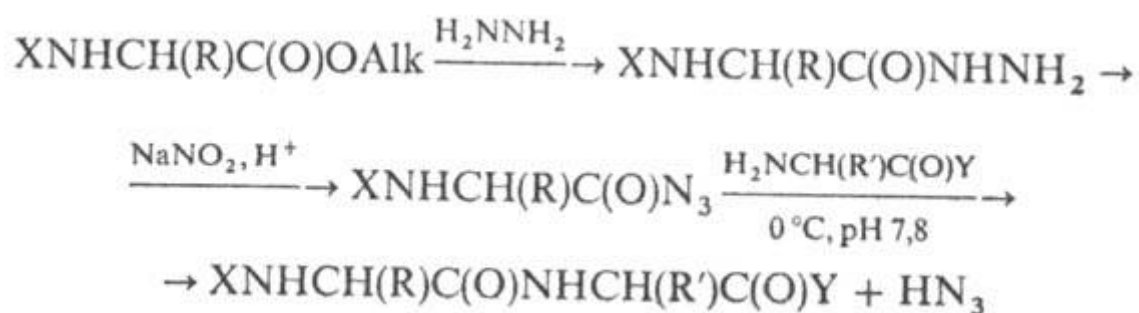


Рис.1.5. Активація карбоксильної компоненти з перетворенням її в пептид [25].

З огляду на нестійкості азидів їх в своб. вигляді з розчину, як правило, не виділяють. Якщо замість нітритів лужних металів для реакції з гідразидом використовувати алкілові ефіри азотистої кислоти (наприклад, Трет-бутилнітрит), то азидивну конденсацію можна проводити в органічному розчиннику, утворений  $\text{HN}_3$  пов'язують третинними амінами [24]. Нерідко азидна конденсація ускладнюється побічними реакціями (перетворення гідразиду не в азид а в амід; реакція гідразиду з азидом, яка призводить до утворення 1,2-ДІАЦ-гідразину; проміжне утворення ізоціаната, котрий в результаті перегрупування Курціуса може призводити до похідного утворення сечовини або відповідно уретаном і інші) [25]. Переваги азидного методу-мала ступінь рацемизації, можливість застосування серина і треоніну без захисту гідроксильних груп [24, 25].

У живої матерії амінокислоти знаходяться як у вільній формі, так і пов'язаному один з одним вигляді. Зв'язування відбувається між  $\text{COOH}$ - групою однієї амінокислоти і  $\text{NH}_2$ - групою іншої амінокислоти, а утворену зв'язок називають пептидного. Формально освіту пептидного зв'язку можна представити схемою [24].

Утворення дипептида

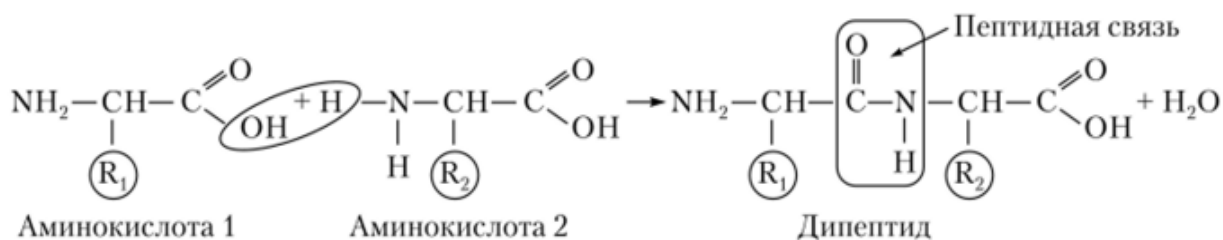


Рис.1.6. Утворення дипептида [24].

У лабораторних умовах це здійснюється більш складно. Щоб амінокислоти з'єдналися в потрібному порядку, функціональні групи, які не підлягають з'єднанню, захищають (хімічно пов'язують). Або, навпаки, активують ті функціональні групи, які повинні прореагувати [25]. Найбільшого поширення набув метод, запропонований Р. Мерріфілд [24]. У цьому методі С-кінцеву амінокислоту пептиду  $\text{COOH-}$  групою фіксують на полімері, а до вільної  $\text{NH}_2$ -групи приєднують другу з кінця амінокислоту. Таким чином збірка поліпептиду здійснюється «задом наперед» - від останньої амінокислоти до першої [24].

Ексклюзивність методики полягає ще й у видаленні домішок. У будь-якому хімічному синтезі є речовини, які не набрали реакцію, будь-які побічні продукти [25]. Традиційний спосіб передбачає відділення продукту реакції від домішок після проведення кожної стадії. У випадку з білками, коли потрібно синтезувати сотні пептидних зв'язків, такий спосіб не можна назвати прогресивним [24]. За ідеєю Мерріфілд, С-концева амінокислота закріплюється на твердому носії до повного закінчення синтезу всього поліпептиду і поміщається в спеціальний реактор (колонку). Наступна амінокислота вводиться в надмірній кількості, щоб взаємодія відбулося максимально повно. Коли пептидний зв'язок утворена, в колонку подається відповідний розчинник і змиває побічні продукти. Потім приєднують третю амінокислоту і т.д [25].

«За запропоновану методологію хімічного синтезу на твердих матрицях» Р. Б. Мерріфілд був удостоєний Нобелівської премії з хімії в 1984 р [24].

У живій природі пептидний зв'язок утворюється завдяки складному ферментативному механізму. Крайня зліва амінокислота містить вільну  $\text{NH}_2$ -

групу, тому її називають N-кінцевий, а крайня праворуч амінокислота зберегла свою COOH-групу, тому таку амінокислоту називають С-кінцевої . При цьому N-кінцева амінокислота вважається першою, наступна за нею - другий, і т.д., а С-кінцева амінокислота - остання [25].

Схема будови пептиду (рамками виділені пептидні зв'язку)

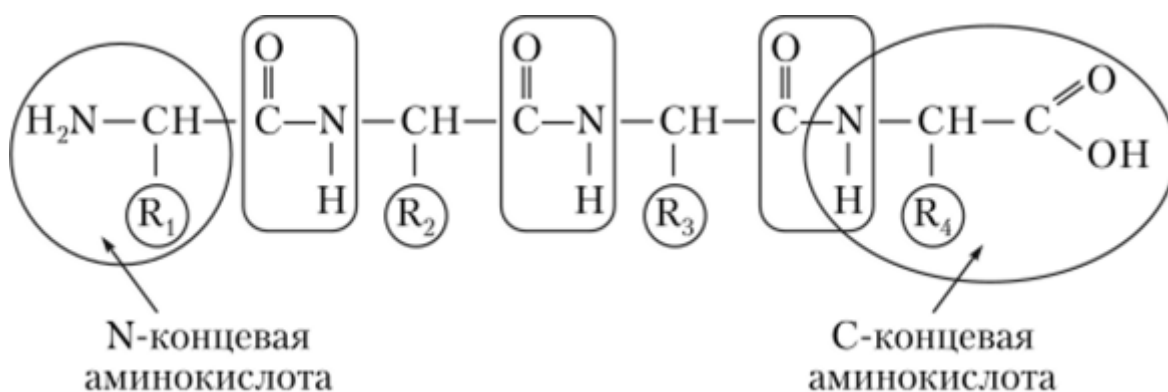


Рис.1.7.Схема будови пептиду (рамками виділені пептидні зв'язку) [25].

Назва пептиду утворюють з назви амінокислот, що входять до його складу. При цьому можливі три варіанти.

У першому випадку амінокислоти позначають скороченими назвами, але N-кінцеву амінокислоту - додатковим символом Н, а С-кінцеву - додатковим символом ОН. Наприклад, тетрапептид, представлений на рис. 3.21, буде називатися Н-Мет-Фен-Тре-Арг-ОН [25].

У другому випадку в назві підкреслюють, що всі амінокислоти, за винятком останньої, знаходяться в формі ацилов. Тому в назвах цих амінокислот закінчення замінюються на суфікс іл>, а назва С-кінцевої амінокислоти залишається без змін [26]. Аспарагінова і глутамінова кислоти і їх амідні мають однакові коріння. Щоб відрізнити ацильні назви цих сполук, прийнято залишки Асп і Гли позначати відповідно аспарагіл і глутаміл, а залишки АСН і Глн - асіарагі- Ніл і глутаміну [25].

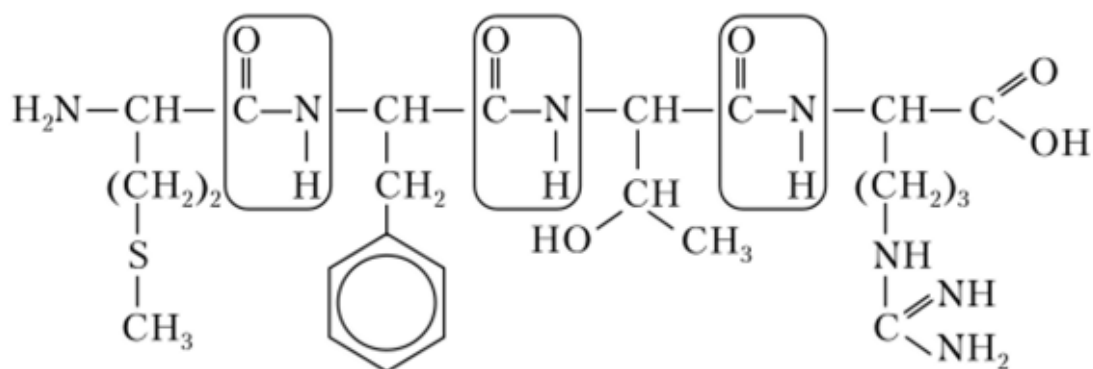


Рис.1.8. Приклад тетрапептида [25].

Способи його назви: а) Н-Мет-Фен-Тре-Арг-ОН; б) метіоніл-феніліланілтреона-аргінін; в) MFTR

Для назви довгих амінокислотних послідовностей застосовують третій спосіб: використовують однобуквені позначення амінокислот. Таким чином, метіоніл-феніліланіл-Треона-аргінін буде названий як MFTR [24].

У назві пептиду вказують всі особливості його побудови. Наприклад, глутатіон - це трипептид, утворений глутамінової кислотою, Цис і Гли. Але глутамінова кислота утворює пептидний зв'язок своєї у-карбок- сильної групою, найбільш віддаленої від NH<sub>2</sub>-групи. На цьому наголошують в назві - у-глутамілцистеїлгліцин [24, 26].

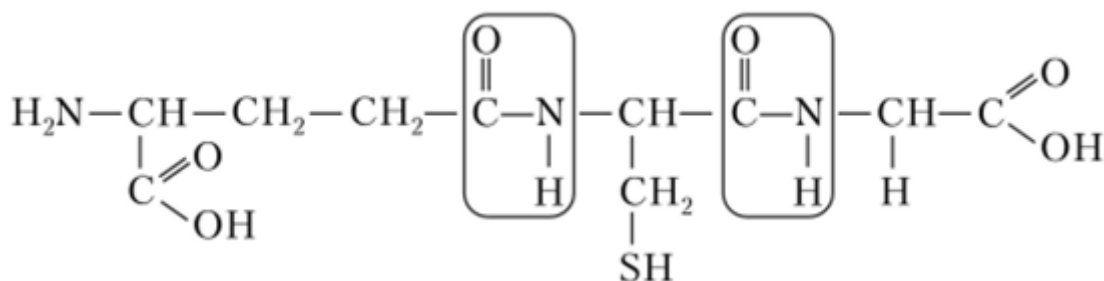


Рис.1.9. Будова глутатіону[24].

Багато пептиди виконують певні функції в організмі. Причому біологічні властивості пептидів обумовлені набором амінокислот, що входять до їх складу [24]. Наприклад, глутатіон - це біологічно активний пептид. Завдяки своїй активній SH-групі в залишку Цис він бере участь в окисно-відновних реакціях типу гідрування-дегідрування, підтримуючи внутрішню рівновагу організму у відповідь на різні антропогенні навантаження навколишнього середовища [25].

Існують і інші приклади пептидів, що відіграють важливу роль в обміні речовин в клітині. Наприклад, карнозин (р-аланілгістидін), який бере участь в скороченні м'язів [25].

Відомий замінник цукру аспаратат - дипептид. Він утворений з аспарагінової кислоти і метилового ефіру фенілаланіну і солодше цукру в 160-200 разів [25].

Нанопептідами є гормони задньої долі гіпофіза окситоцин і вазопресин

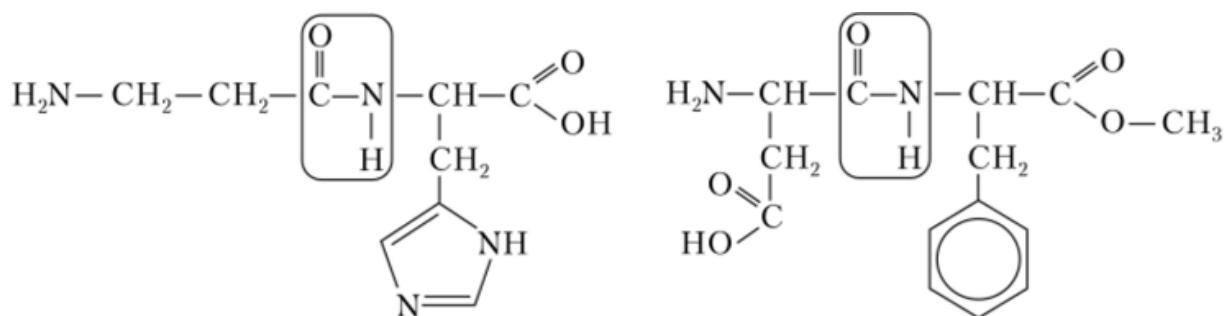


Рис.1.10. Структура аспартама [25].

Від наявності функціональних груп в структурі пептиду залежать його фізико-хімічні властивості: ступінь іонізації, розчинність і ін., Які використовуються в різних методах виділення та ідентифікації пептидів [25]. Наприклад, ізоелектричної точки (рі) пептидів приблизно можна розрахувати як середнє арифметичне констант дисоціації (рК) кінцевих амінокислот і бічних іонізованих радикалів [25]:

$$pI = \frac{pK_1 + (pK_3^1 + pK_3^2 + \dots + pK_3^n) + pK_2}{n + 2}.$$

Рис.1.11. Формула ізоелектричної точки (pI) пептидів [25].

### 1.2.2. Технології отримання пептидів з відходів рибної промисловості

#### *Отримання біоактивних пептидів*

Гідролізати рибного білка містять пептиди з 2–20 амінокислотних послідовностей після гідролізу, і ці пептиди зазвичай мають біологічну активність [26]. Ці біоактивні сполуки є основними компонентами харчових продуктів, включаючи білки, і стають доступними шляхом гідролізу під час травлення [27]. Альтернативно, для вивільнення біоактивних пептидів з вихідного білка використовуються кілька методів екстракції, до яких належить кислотно-лужний гідроліз [26]: вилучення колагену за допомогою кислого або лужного реагенту; ферментативний гідроліз: використання ферментів для гідролізу рибної шкіри; метод ферментації: використання мікроорганізмів як джерела ферментів [26].

На додаток до їх біоактивності, під час гідролізу рибного білка також посилюються структурні та функціональні властивості, такі як розчинність, піноутворення, емульгування, водо- і жирозахисні можливості [27].

#### *Методи отримання білкових гідролізатів*

Традиційною технологією переробки відходів рибопереробних виробництв є переробка з використанням подрібнення, нагрівання, пресування і сепарації відокремленого рибного жиру [22, 28]. З метою комплексної переробки рибних відходів, що містять і білкову та ліпідну фракції, необхідно використовувати технологію, що дозволяє розділити і утилізувати обидві фракції [28]. Традиційний вид обробки сировини в даному випадку викликає ряд небажаних наслідків внаслідок легкої окислюваності і нестабільності жирової фракції і невеликого виходу білкової фракції [27].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						36
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Для ефективної переробки сировини, що містить як білкову так і ліпідну фракції застосовується гідроліз, який дозволяє отримати на виході як риб'ячий жир так і рибний білковий гідролізат [22, 28].

Наразі, за кордоном активно ведуться роботи з пошуку нових біотехнологічних підходів для розробки технологій ефективного вилучення жиру з рибного відходів [28].

В залежності від застосовуваного в процесі гідролізу каталізатора розрізняють хімічний і ферментативний гідроліз [28].

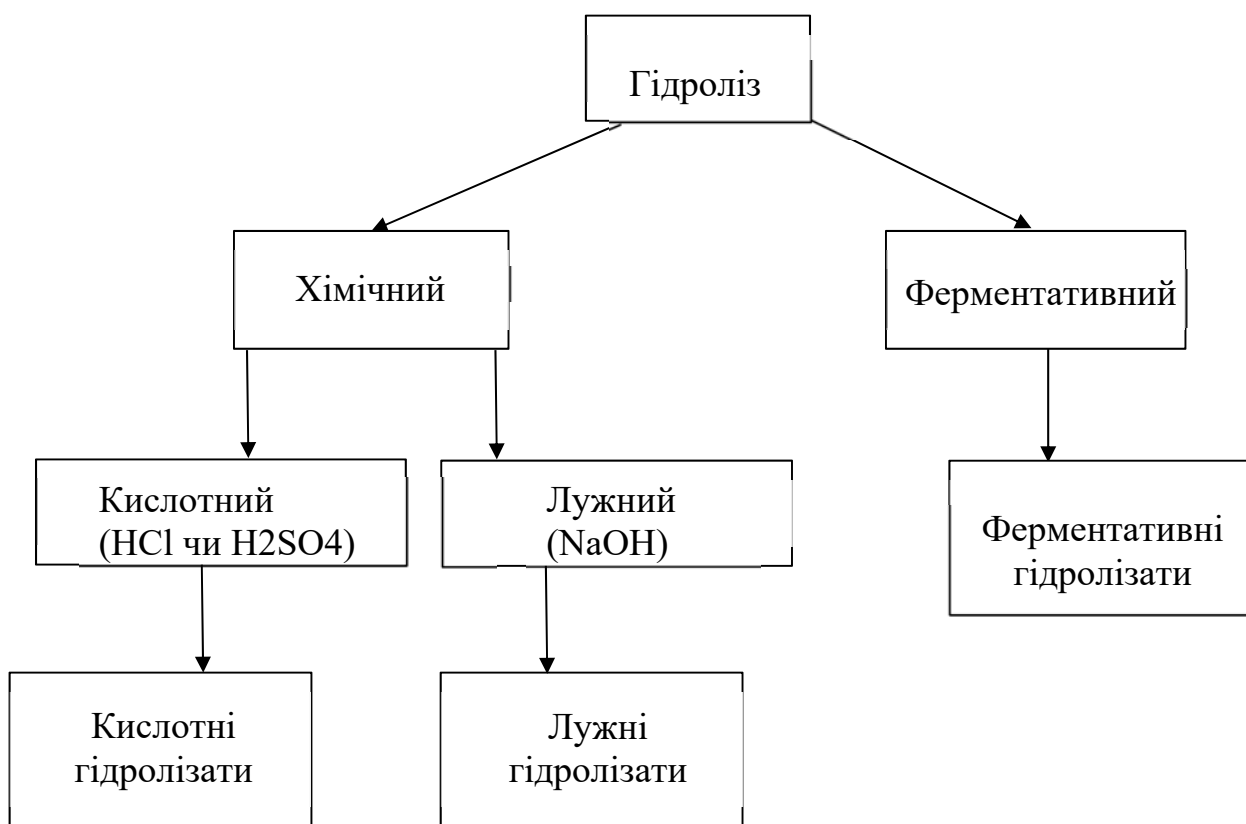


Рис.2.1. Класифікація методів білкового гідролізу [28].

### *Хімічний гідроліз*

На даний момент хімічний гідроліз білка є найбільш поширеним способом отримання білкових гідролізатів, незважаючи на ряд недоліків (небезпека

проведення хімічного гідролізу в зв'язку із застосуванням небезпечних реагентів і недбалого ставлення до сировини) [28].

Хімічний гідроліз (кислотний) протікає в жорстких умовах (при температурах кипіння розчинів і вище, і під тиском), при яких руйнуються не тільки молекули білка і патогенна мікрофлора, а й цінні амінокислоти. В ході кислотного гідролізу відбуваються руйнування триптофану, треоніну, серину, дезанімінування аспаргіна і глутаміна, руйнування вітамінів [27]. Ще один істотний мінус застосування кислотного гідролізу - це утворення побічних продуктів гідролізу у вигляді солей відповідних кислот [28].

В цілому хімічні методи білкового гідролізу потребують підвищеної уваги до апаратного виконання і техніки безпеки на виробництві, так як кислоти і луги - є агресивними середовищами і можуть виводити техніку з ладу, за рахунок своїх корозійних властивостей [29].

#### *Кисотно-лужний гідроліз*

Лужний спосіб гідролізу найменш популярний в промисловості, так як склад гідролізату, одержуваного з його допомогою має незадовільні характеристики якості і безпеки, так як містить токсичні для людини і тварин речовини - структурні частини лантіоніна і лізіноаланіна [29].

Під час гідролізу шкіри риб кислотно-лужним гідролізом деякі амінокислоти, наприклад, триптофан, серин та треонін, можуть бути знищені при високому рН [29]. Тому за рН і температурою гідролізатів слід уважно спостерігати в процесі гідролізу.

Ванг в своєму дослідженні [29] описує екстракцію колагену з шкіри риби шляхом кислотно-лужного гідролізу, що включає обробку попередньо очищених зразків шкіри лугом (NaOH) як початкову стадію. За цим етапом слідує постійне перемішування при контрольованій температурі протягом заданого часу [22, 29]. Процедура повторюється приблизно 3 рази і вона проводиться з метою

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						38
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



видалення неколагенових білків і пігментів. Після цього шкіру обробляють кислотою (HCl) [29].

Після кислотно-лужної обробки шкіру промивають для нейтралізації рН і подальшу екстракцію проводять дистильованою водою при 65 ° С протягом 4 год. Деякі процедури вилучення включають етап знежирення. Видаляють жир за допомогою бутилового спирту протягом 24–48 год при легкому перемішуванні та зміні розчину кожні 8 год [22, 29]. Потім отриману речовину піддають кислотній обробці оцтовою кислотою протягом 24 годин при легкому перемішуванні [22].

Таким способом можна також отримувати колаген з шкіри та кісток риби. Колаген екстрагують 0,5 М оцтовою кислотою при співвідношенні проба / розчин 1: 100 (мас./Об) протягом 24 год при постійному перемішуванні [30]. Екстракти центрифугують при 20 000 г протягом 1 год при 4 °С, і етап екстракції повторюють з використанням отриманого залишку з подальшим центрифугуванням в тих же умовах [29]. Супернатанти двох екстрактів об'єднують і осаджують додаванням NaCl до кінцевої концентрації 0,9 М. Після цього центрифугують при 2500 г протягом півгодини, отримуючи осад, який необхідно розчинити у 0,5 М оцтовій кислоті [29].

Далі осад піддається діалізу протягом 48 год проти 10 об'ємів 0,1 М оцтової кислоти та дистильованої води відповідно, яку необхідно змінювати кожні 8 год, перш ніж ліофілізувати. Антимікробні пептиди очищають від епідермісу зимової камбали та екстрактів слизу [29]. Слиз отримують з шкіри шляхом вискоблювання і далі піддають гомогенізації в розчині 50 мл 0,2 М ацетату натрію, 0,2% тритона X-100 та 1 мм фенілметилсульфонілу фториду [29, 30]. Гомогенат центрифугують протягом 20 хв при 20000 г, і отриманий супернатант далі очищають [29].

#### *Ферментативний гідроліз*

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						39
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Іншим інноваційним методом, що дозволяє отримувати пептидний продукт високої якості з рибних відходів, є ферментативний гідроліз, або так звана ферментативна екстракція, що протікає в м'яких умовах в нейтральному, слабокислому або слаболужному середовищі [30].

Значна частина робіт в цьому напрямку присвячена пошуку нових ефективних протеолітичних агентів, які забезпечують високий вихід і якість одержуваних ліпідних препаратів з урахуванням широкої варіабельності видів рибних відходів [31].

Окремі праці присвячені пошуку оптимальних параметрів ферментативної екстракції ліпидовмісних рибних відходів [32].

Ферментативний гідроліз проводять в присутності промислово одержуваних ферментів тваринного, рослинного і мікробного походження, таких як панкреатин, пепсин, папаїн, бромелін протосубтилін і інші [31]. Такі ферменти мають порівняно високу вартість внаслідок чого для здешевлення технології пропонують використовувати для переробки відходів ферменти вже присутні в відходах риб [32].

Ферментативний спосіб переробки відрізняється тим, що практично не призводить до руйнування амінокислот, що входять до складу білка і не призводить до протікання небажаних реакцій рацемізації [31]. Ефект і переваги ферментативної обробки під час добування біологічно активних молекул з відходів від оброблення риб в порівнянні з методами, які застосовують хімічні реагенти підтверджується рентгенофазовим аналізом, що показує, що ферментативна екстракція дозволяє повністю зберегти кристалічну структуру колагену і видалити всі домішки, в тому числі неколагенових білків [33].

При цьому ферментативний спосіб має істотні недоліки: низьким виходом цільового продукту з сировини, високою вартістю комерційних ферментів, труднощами в отриманні стандартних продуктів, засміченням цільових продуктів білками мікроорганізмів або ферментами, тривалим часом ферментолізу, багатостадійну виробництва, необхідністю забезпечення

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						40
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

стерильності процесу ферментоліз [31]. Устаткування для ферментативних виробництв вельми дороге і вимагає особливих умов експлуатації (контроль підтримки режиму ферментації, регулярна стерилізація ємностей, реакторів, трубопроводів, контроль за відсутністю зараження) [22, 31].

Рентгенофазовий і морфометричний аналіз продуктів показав високий ступінь впорядкованості колагену і збереження його кристалічної структури під час обробки ферментами [31]. Аналіз даних інфрачервоної спектроскопії отриманих продуктів дає можливість говорити про те, що екстрагування ферментами дозволяє зберегти упорядкованість нативної структури молекули колагену в порівнянні з продуктами, отриманими екстрагуванням хімічними кислотами і лугами [33].

Ферментативний спосіб отримання білкових гідролізатів з рибних відходів є найбільш перспективним для вивчення і застосування через специфічність каталізаторів і вихідної сировини, що вимагають індивідуального підбору умов проведення реакції в залежності від їх виду [31].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						41
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

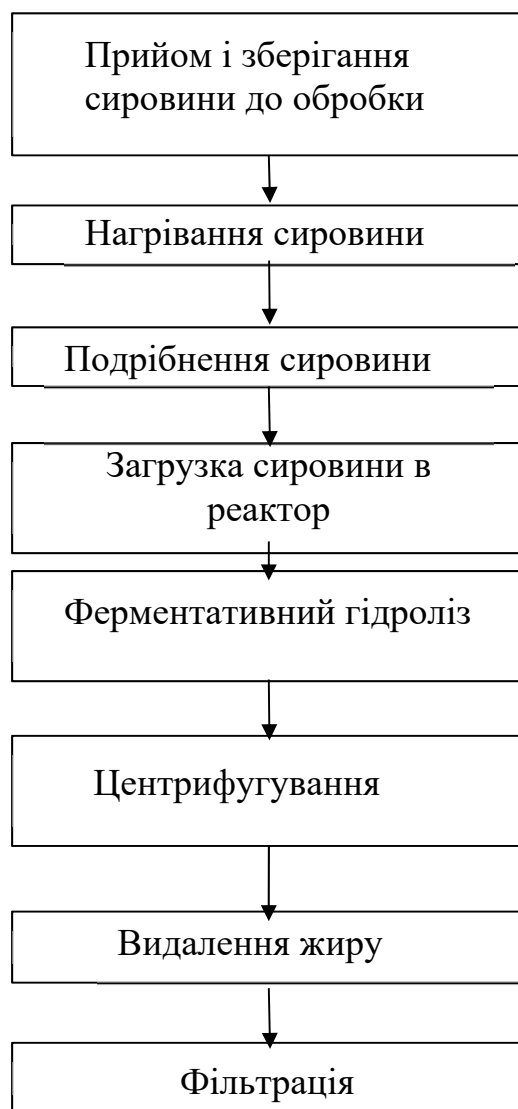


Рис.2.2. Схема переробки рибних відходів із застосуванням технології ферментативного гідролізу [32].

Найбільша біохімічна активність у більшості ферментів проявляється лише при певних концентраціях водневих іонів, і, навіть, незначні відхилення рН середовища від цього оптимуму послаблює активність ферменту, або змінює характер його дії [31]. Наприклад, оптимум рН для типових протеолітичних ферментів: трипсин - 7,8-9,5; пепсин - 1,5-2,5. Крім того, для кожного ферменту існує певний температурний оптимум (для амілази - 50 ° С, пепсину і

трипсину - 37 ° С). При нагріванні до 70 ° С більшість ферментів інактивуються, а при 100 ° С вони руйнуються [31, 33].

Переваги гідролізу полягають в селективності каталізу речовин, високій ефективності, так як даний спосіб дозволяє отримувати готовий продукт з складом амінокислот, що є ідентичним амінокислотному складу вихідної сировини [33]. Збереження амінокислот забезпечується, в тому числі, «м'якими» умовами протікання реакції ( $t_0 = 35 \div 50$  °С, рН близькі до нейтральних значень, тиск атмосферний) [33].

Ще одна істотна перевага полягає в тому, що при ферментативному гідролізі руйнується структурна зв'язок білка з жиром, що дозволяє з легкістю відокремити останній, щоб провести подальшу сушку білка без побічних продуктів і додаткових маніпуляцій [31].

Ферментативний гідроліз - найкращий спосіб гідролізувати рибну шкіру, не втрачаючи поживної цінності [32]. Цей спосіб є найбільш поширеним особливо в харчовій та фармацевтичній промисловості, оскільки процес гідролізу не залишає в своїх продуктах залишкових органічних розчинників або токсичних хімікатів [33].

Ферментативний гідроліз вважається найбільш природним методом гідролізу білка [31]. Ця методика застосовується протягом століть, особливо в країнах Східної Азії, як традиційний метод збереження [33]. Ферментація не тільки підсилює смак та смак їжі, але й підвищує її харчову цінність.

Під час процесу ферментації біоактивні пептиди вивільняються під дією як мікроорганізмів, так і ендогенних протеолітичних ферментів [22]. Кілька досліджень продемонстрували біологічну активність різних морських продуктів, таких як тайський ферментований креветки паста, креветки побічних продуктів, кальмарів місо, і різноманітні традиційні ферментовані рибні продукти [22, 33].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						43
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Етапи ферментативного гідролізу включають підготовку субстрату, вибір правильного ферменту, вимірювання ступеня ферментативного гідролізу, гомогенізацію та нагрівання для інактивації ендогенних ферментів, гідролізу та припинення ферментативної реакції [22, 33].

Для ферментативного гідролізу використовуються комерційні ферменти, такі як алкалаза, трипсин, пепсин, папаїн, панкреатин та термолизин [34]. Такі умови, як концентрація ферменту, рН, час та температура, повинні добре контролюватися та підтримуватися під час гідролізу [34]. Концентрації ферментів, рН та температура змінюються залежно від типу використовуваного ферменту [22].

У дослідженні Халіма [35] були затверджені ферментні концентрації 0,01-5,00% і діапазон рН від 1,5 до 11. Желатин розчиняли у DW та піддавали ферментативному гідролізу із співвідношенням фермент / субстрат 30 : 1, рН 10,0 та 50 ° С [35].

Розчин желатину врівноважували за 30 хв до додавання ферменту. РН підтримували додаванням 2N NaOH, і через 3 год ферменти інактивували нагріванням розчину при 95 ° С протягом 20 хв [36]. І після цього проводили екстракцію пепсино розчинного колагену з шкіри риби за описаним методом [36]. Нерозчинений залишок, отриманий після екстракції кислого розчинного колагену, був використаний для екстракції PSC [36].

Валд [37] у своєму дослідженні описував побічні продукти, що утворюються при обробленні форелі пепсином. Він вивчав та характеризував їх з точки зору антибактеріального впливу проти харчових забруднень та збудників рибного господарства [36]. Після гідролізу, що тривав 25 хв, гідролізати демонстрували інгібіторну активність щодо кількох грампозитивних та грамнегативних бактерій [37]. Було виявлено, що ступінь гідролізу чинить значний вплив на антибактеріальну активність, при значному збільшенні спостережуваного гальмівного ефекту на початку гідролізу [22, 37]. Найвищу

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						44
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

антибактеріальну активність отримували при ступені гідролізу 30% (співвідношення фермент / білок 0,04 ОД / мг білка, активність ферменту 6,5 ОД / мг білка, умови гідролізу 37 °С, рН 3,0). Найвища антибактеріальна активність виявлена проти бактерій *Flavobacterium psychrophilum* та *Renibacterium salmoninarum*, з мінімальними концентраціями інгібування 2 мг/мл і 5 мг/мл відповідно [36]. Визначення амінокислоти гідролізату (ДН 30%) показало, що основні залишки лізину, лейцину, аланіну, аргініну, гліцину, аспарагінової кислоти та глютамінової кислоти є основними амінокислотами [36].

#### *Виділення колагену з морської риби*

Ще один популярний пептид – колаген - можна виділяти з морської риби, оскільки білки морської риби в основному складаються з колагену, який завдяки своїм зволожуючим властивостям широко застосовується в косметології [38]. На рис.2.3. показані загальні процедури для виділення колагену з шкіри та кісток морської риби [38]. Розчинення кислотою та солубілізація пепсином - це основні методи виділення колагену з різних частин риб (наприклад, шкіри, кістки та лусочки) [35].

Для кислоторозчинного методу (ASC) використовується 0,5 М оцтова кислота для розчинення шкіри риби впродовж достатнього часу, тоді як для методу солубілізації пепсином (PSC) використовується 10% пепсин [36].

Білки морської риби складаються з дрібних пептидів, які часто присутні в неактивній формі з повною послідовністю білка [38]. Ферментативний гідроліз часто використовується для виділення коротких та біоактивних речовин пептидів з морських організмів та відходів морепродуктів [38].

Велика кількість гістидинових дипептидів, карнозину ( $\beta$ -аланілгістидин) та ансерину ( $\beta$ -аланіл-1-метилгістидин) присутні у тунці, лососі та вугрі. Пептиди служать важливими діючими речовинами для фармацевтичних та косметичних препаратів [39]. Морські рибні пептиди проявляють різні біологічні дії, такі як антиоксидантну, антимікробну та інгібіторну активність, що перетворює

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						45
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ангіотензин-I, а також гальмування метастазів раку, та імуностимулюючу активність [40]. Найчастіше використовувані протеїнази для гідролізу рибних білків включають алкалазу, хімотрипсин та пепсин [41].

На рис.2.3. показані загальні процедури отримання пептидів колагену з шкіри та кісток морської риби [42]. Пептиди зазвичай відокремлюють за допомогою хроматографічних методів та ультрафільтрації [39]. Також існують дослідження, які описують метод використання серії мембран для ультрафільтрації для розділення пептидів [42]. Для очищення пептидів широко використовують також хроматографію (RP-HPLC).

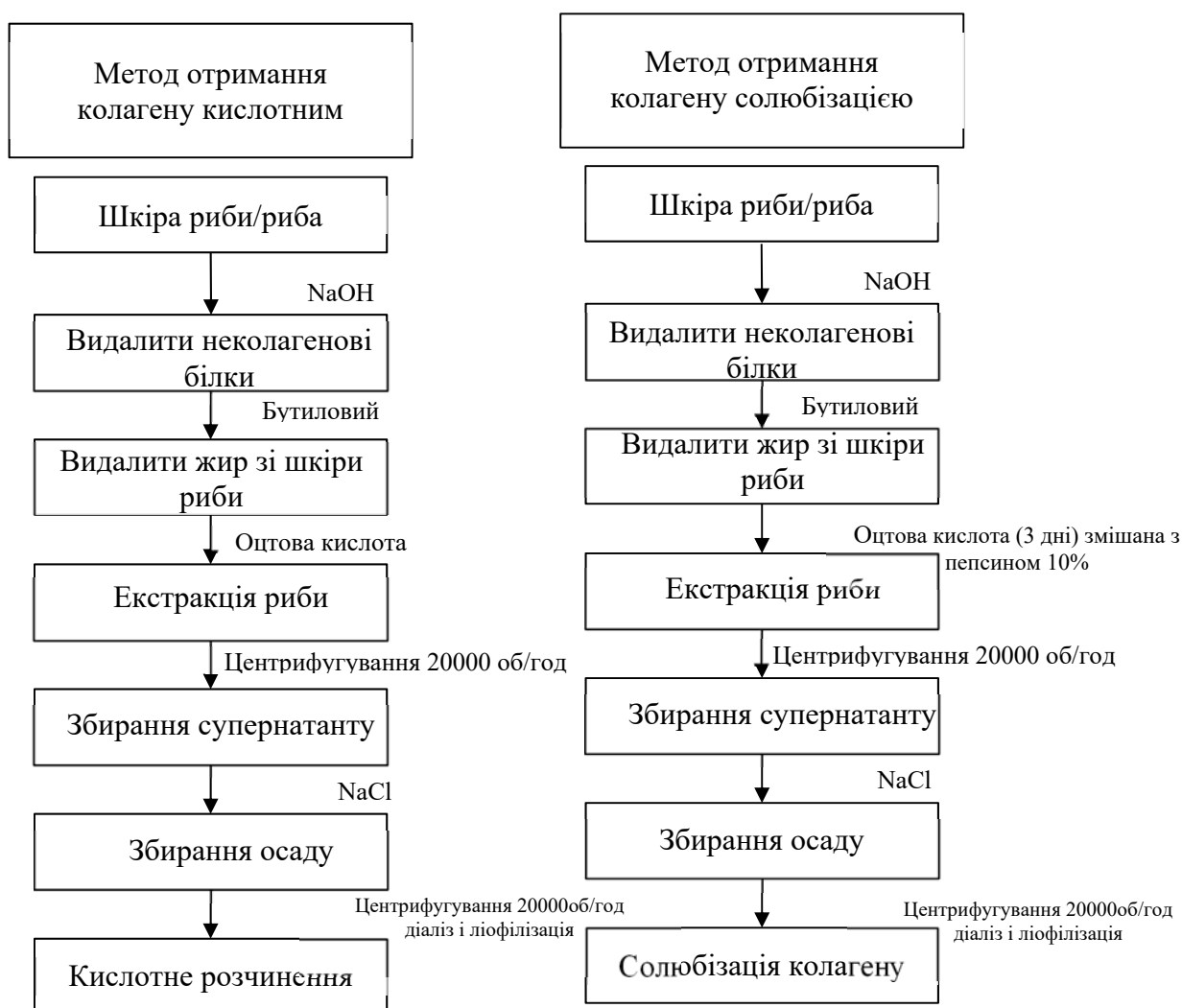


Рис.2.3. Методи виділення колагену зі шкіри морської риби.



## Екстрагування

Спосіб екстрагування справляє визначальний вплив на властивості одержуваних продуктів [43]. Одним із способів екстракції цільових речовин з відходів є спосіб із застосуванням органічних розчинників (екстракційний спосіб). Цей спосіб дозволяє отримати тільки концентрат і тому цей метод майже не використовується для виробництва гідролізатів та ізолятів [43].

Для отримання концентрату сировину обробляють розчинниками, наприклад, спиртом, до трьох або чотирьох разів послідовно [41]. Вихід білкового концентрату при такому способі може становити до 15%. Вміст білка в кінцевому продукті досягає близько 60-80% [44].

Рибні білкові гідролізати, одержувані за допомогою органічних розчинників, відрізняються високою харчовою цінністю і відмінними органолептичними показниками (білий колір, відсутність специфічного смаку і запаху) [44].

Основними недоліками екстракційного способу переробки відходів гідробіонтів є неможливість збереження нативної структури і властивостей білка і недостатнє очищення від жиру [22, 41]. Внаслідок чого використання таких способів не є широко застосовуваним в промисловості. Білки, отримані таким способом, втрачають свої функціональні властивості - мають низьку розчинність, низьку емульгуючу і піноутворюючу здатність, в наслідок втрати нативної структури під впливом органічних розчинників в жорстких температурних режимах [44]. Також дані способи пов'язані з високими втратами і як наслідок високою вартістю кінцевого продукту [45].

У технології екстрагування білка Кирилова з кісткових відходів оброблення промислових риби сімейств лососевих, тріскових і скумбрієвих описаний пошук оптимальних параметрів всіх технологічних процесів [44, 45]: рН, Е<sub>h</sub>, типу і концентрації електролітів, співвідношення сировини: електроліт (гідромодуль),

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						47
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

ступеня диспергування сировини, часу обробки, а також умови промивання, нейтралізації і сушки продуктів.

Основним критерієм для визначення ефективності екстрагування білків з кісткових відходів від розбирання форелі служило візуальне визначення наявності розпаду структури кістки до частинок діаметром 0,1 мм, а також визначення процентного вмісту неорганічних речовин [41]. В результаті було виявлено, що найбільш повне розчинення сировини відбувається при температурі обробки 85 С, рН  $12,0 \pm 0,3$ , гідромодуль 1: 6-1: 4 і часу обробки  $40 \pm 15$  хв [41].

Була розроблена технологія екстрагування білків з кісткових відходів риб, що включає наступні стадії [42]:

1. Свіжу або розморожену сировину диспергувати на промисловій м'ясорубці до розміру часток не більше 5х10-3м.
2. Напрацювати католіт (слабкий сольовий розчин, оброблений в катодній камері діафрагмового електролізера). Дисперговану сировину змішують з католітом з рН не менше 12.4, в співвідношенні 1: 6.
3. Витриману суміш термостатують в реакторі з мішалкою при температурі 100 С протягом 45 хвилин.
4. Після витримування в реакторі суміш направляють на фільтр або центрифугу з діаметром пор фільтра не більше 100 мкм, де відбувається відділення допротеїнованої сировини. Осад промивають водою і відправляють на сушку.
5. Фільтрат в разі жирних відходів (тріска і скумбрія) сепарують на молочному сепараторі при 30 °С, отримуючи жир.
6. Фільтрат після сепарації висушують на розпилювальній сушарці (або на інертних носіях)

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						48
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

### *Очищення пептидів*

Біологічна активність пептидів визначається такими властивостями, як молекулярна маса, заряд та гідрофобність [43]. Тому пептиди очищаються за допомогою багатоетапного процесу очищення, виходячи з таких властивостей. Очищення на основі молекулярної маси використовує такі методи, як ультрафільтрація (УФ), нанофільтрація (НФ) та гель-фільтрація (ГФ) [41].

Іонообмінна хроматографія (ІОХ) використовується для фракціонування пептидів на основі їх чистого заряду [41]. Потім фракціоновані пептиди додатково очищають за допомогою таких технологій, як ВЕРХ з оберненою фазою, яка відокремлює сполуки на основі гідрофобності та гідрофільності [42]. Потім пептидні послідовності найактивніших фракцій піддають аналізу HPLC та ідентифікують за допомогою методів мас-спектрометрії, таких як матрична лазерна деіонізація (MALDI-TOF), іонізації ESI, лазерна десорбція / іонізація (MALDI-MS) тощо [42].

### *Технологія солюбізації*

Рибні м'язові білки можуть бути відновлені з побічних продуктів за допомогою відносно нової технології переробки, яка називається ізоелектричною солюбілізацією / осадженням (ISP) [44]. Ця технологія спирається на ізоелектричну точку (pI) м'язових білків. pI білка - це рН, при якому чистий (тобто загальний) електростатичний заряд білка дорівнює нулю [45]. Це означає, що значення pI може впливати на розчинність білка при заданому рН.

Існує п'ять кроків до відновлення білків і ліпідів від побічних продуктів переробки морепродуктів за допомогою ISP [36].

На першому етапі побічні продукти гомогенізуються у воді у співвідношенні 1: 6 (побічні продукти: вода). Метою є створення реакційного середовища та збільшення доступної площі поверхні для подальшої реакції солюбілізації білка [45].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						49
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

На другому етапі м'язовий білок розчиняється шляхом додавання до розчину кислоти або основи [45]. Це включення кислоти або основи відсуває рН від рІ - отже, білки м'язів риб приймають більш негативний або позитивний поверхневий заряд відповідно до лужних або кислих умов [46]. Це призводить до електростатичного відштовхування білок-білок, що послаблює білково-білкові гідрофобні взаємодії з одночасним посиленням електростатичних взаємодій білок-вода [45]. Зрештою, ці зміни призводять до розчинності білка у воді.

На третьому етапі центрифугуванням відокремлюють розчин на легкі, середні та важкі фракції, що містять риб'ячий жир, розчинені м'язові білки та домішки (кістки, налип, шкіра, нерозчинні білки тощо) відповідно [44]. Таким чином, третій крок призводить до відокремлення сирової олії з морепродуктів, багатої на  $\omega$ -3 поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК), які можуть бути додатково перероблені для численних харчових та непродовольчих продуктів [44]. Видалити мембранні фосфоліпіди важко через їх амфіфільний характер. Більше 50% мембранних фосфоліпідів утримуються з розчиненими білками після третьої стадії [44].

Зазвичай мембранні фосфоліпіди присутні у м'язі морепродуктів у меншій кількості, ніж тригліцериди [43]. Однак мембранні фосфоліпіди більше сприяють згірченню та окисленню ліпідів. Тому бажано видалити якомога більше ліпідів під час етапу поділу [43]. Навпаки, гідрофобні тригліцериди досить легко відокремити від розчину. Важка фракція багата на такі мінерали, як Са, Mg та Р; і тому може бути головним інгредієнтом у розробці кормів для тварин та кормів для домашніх тварин з доданою вартістю [43].

На четвертому етапі середню фракцію, що містить розчинені м'язові білки морепродуктів, піддають другій корекції рН, або рІ [36]. Середній рІ м'язових білків морепродуктів - 5,50. При 5,50 рІ м'язові білки осідають через посилення білково-білкових гідрофобних взаємодій та зменшення взаємодії білок-вода, а також зменшення електростатичного відштовхування білок-білок [22,

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						50
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

41]. Аналогічно до першого регулювання рН на другому етапі, оскільки білки поступово припиняють взаємодію з водою, в'язкість значно збільшується [41].

Цю проблему в'язкості можна подолати постійним підтриманням рН на рівні 5,50.

На п'ятому етапі осаджені м'язові білки морепродуктів відокремлюються від технологічної води, як правило, центрифугуванням. Потім технологічну воду можна переробляти і використовувати на першому етапі, якщо використовується безперервна система [45].

Ізолят рибного білка (FPI) також був вилучений з цільної потрошеної форелі за допомогою ISP [36, 43]. ППІ використовувались як основний інгредієнт у нагрітих гелях, виготовлених із олій  $\omega$ -3 PUFAs (ляне насіння, водорості, риба, криль та суміш) та замічник солі на основі KCl [43]. Це дослідження показало, що функціональні харчові продукти, розроблені з ППІ, були поживно підвищені за допомогою  $\omega$ -3 PUFAs [43]. Коефіцієнти  $\omega$ -6 /  $\omega$ -3 FA та ненасичені / насичені FAs та показники тромбогенності та атерогенності залежали від специфічних масел, багатих  $\omega$ -3 PUFAs, що використовуються для укріплення гелів для ізоляції білка [43]. Окиснення ліпідів в укріплених гелях  $\omega$ -3 PUFAs було мінімальним, хоча і більшим ( $P < 0,05$ ), ніж у контрольних гелях (без фортificaції  $\omega$ -3 PUFAs). Розроблені харчові продукти мали зменшення натрію та збільшення калію [41]; в той час як властивості кольору та текстури були хорошими, а властивості гелеутворення покращувалися [43].

#### *Технологія отримання водних екстрактів і гідролізатів*

В дослідженні Караулової [44] наведена технологія отримання водних екстрактів і гідролізатів з використанням м'яких тканин двостулкових молюсків: корбикул японської *Corbicula japonica* і мерценарії *Mercenaria mercenaria*, а також печінку кети *Oncorhynchus keta* [44].

Для отримання екстрактів м'язову тканину і печінку гомогенізували з холодною дистильованою водою у співвідношенні 1 : 1, 10 хв, 4 °C, швидкість

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						51
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

8,5 тис. Об / хв, використовуючи гомогенізатор [44]. Отримані гомогенати центрифугували при 5 тис. Об / хв 15 хв при 4 °С на мікроцентрифузі. Отримані водні екстракти додатково фільтрували через мікрофільтр Whatman (0,45 μm PVDF) [44].

Для отримання гідролізатів використовували харчовий протеолітичний фермент Protamex 1,5 MG (Bacillus протеазний комплекс) [44]. Гідроліз гомогенатів проводили при температурі 45 °С протягом 3,5 год. Гідроліз зупиняли нагріванням суміші до 80 °С протягом 15 хв [44]. Потім суміш центрифугували при 5 тис. об / хв 15 хв при 4 °С на мікроцентрифузі. Отримані гідролізати додатково фільтрували через мікрофільтр Whatman (0,45 μm PVDF) [44].

Також, відомі і інші способи отримання пептидів з гідробіонтів [45]. Наприклад, технологія екстракції оцтовою кислотою тканин шлунково-кишкового тракту морського їжака дає глікопептид, що володіє протизапальною дією [45].

Інший спосіб - екстракція нутрощів морських їжаків етиловим спиртом і подальше фракціонування з використанням гель-фільтрації дозволяє отримати глікозильований поліпептид високого ступеня чистоти [45]. Даний глікозильований поліпептид має протизапальну дію в експериментальних моделях гострого бронхіту, індукованого формаліном у щурів, і бронхіту, індукованого сигаретним димом у щурів, в дозах 25, 50 і 100 мкг / кг [45].

### 1.2.3. Колоїдно-хімічні властивості білкових гідролізатів

Основні показники до використання гідролізатів в різних областях промисловості - колоїдно-хімічні властивості, а саме, в'язкість, розчинність, здатність до емульгування, гелеутворення, піноутворення і інші [45]. Дані властивості багато в чому залежать від виду сировини, що піддається гідролізу, від обраного ферменту-каталізатора і режиму гідролізу, від глибини розщеплення білкових молекул [45]. Розчинність білкових гідролізатів залежить

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						52
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

від способу їх отримання, ступеня гідролітичного розщеплення, значень рН, температури і присутності солей в розчині [45].

У літературі відзначений факт істотно більш високого розчинення білкового рибного гідролізату (гідролізат мойви має розчинність більше 84% в діапазоні рН 2 ÷ 11) в порівнянні з нативними білками або гідролізатами бобових культур (розчинність соєвих білкових гідролізатів знаходиться в межах 20% при рН = 4 ÷ 5) навіть при відносно низькій ступеня розщеплення білкових структур [45].

Термостабільність - важлива якість білкових гідролізатів, являє собою здатність пептидів довше зберігати свої структуру і властивості при впливі температур у порівнянні з нативними білками [46]. Ця властивість властива для гідролізатів білків молочної сироватки, казеїну, сої, а так само м'ясних і рибних гідролізатів [46]. Вона забезпечує можливість сушки гідролізатів на фінальних стадіях процесу переробки [46]. Емульгуючі властивості відіграють важливу роль для харчової промисловості [45]. Встановлено, що при ступеня гідролітичного розщеплення 36% білковий гідролізат оселедця показує хорошу емульсійну здатність, це обумовлено виходом на поверхню гідрофобних амінокислотних залишків, що сприяють утворенню стійких емульсій [45].

Таким чином, можна зробити висновок, що емульгуючі властивості безпосередньо і в значній мірі залежать від гідрофобних властивостей гідролізатів, які впливають на розчинність білкових молекул і пептидів в воді [46]. При збільшенні гідрофобності емульгуюча здатність знижується [46]. Ще одним важливим показником для харчової промисловості є в'язкість гідролізату [45]. При розщепленні пептидних зв'язків спостерігається значне зменшення в'язкості розчину білкового гідролізату в порівнянні з розчином нативних білків [45]. Це пояснюється істотним зниженням гідрофобності гідролізатів, а також збільшенням ступеня їх іонізації в порівнянні з нативними білками. Зниження в'язкості гідролізату також робить позитивний вплив на процес сушіння [45].

На підставі вищесказаного можна зробити висновок, що розробка і впровадження технології отримання ферментативних білкових гідролізатів з

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						53
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

недовикористовуваних рибного сировини є перспективним і затребуваним напрямком для рибопереробної промисловості [45, 46].

#### **1.2.4. Обґрунтування вибору технології вилучення пептидів білкових гідролізатів**

Сировина для описуваного процесу може складатися з білкового матеріалу, переважно риб, рибопродуктів, молюсків, ракоподібних і побічних продуктів рибної / риболовецької промисловості, наприклад відходів та інших водних організмів, що мешкають як в прісній, так і в солоній воді [32]. Різні види сировини можуть використовуватися окремо або у вигляді комбінації продуктів, що містять «ферментний матеріал» і «білковий матеріал». «Ферментний матеріал» є сировина, що містить ендогенні ферменти в достатній кількості і задовільної якості [22, 32]. «Білковий матеріал» є сировина, що не містить ендогенних ферментів задовільної якості в достатній кількості і яке внаслідок цього має бути доповнене ферментним продуктом для того, щоб забезпечити проведення ферментної обробки [33]. Дроблення забезпечує велику робочу поверхню для ферментів і більш швидке виділення сировинних ферментів [40]. Перша система масло / жир може виділятися з сировини до початку процесу ферментації. В даному випадку, наприклад, може використовуватися холодна регенерація масла [38].

Контроль умов в ферментері здійснюють безперервно. Введення різних добавок здійснюють таким чином, що підтримуються якомога більше стабільні умови ферментації в рамках інтервалів значень, які є оптимальними для виробленого продукту [32].

Наприкінці експонентної фази росту бактеріальна культура передається з посівного в основний апарат. Сировину у вигляді білкових і ферментних матеріалів закачують в ферментер [22, 33]. У суміш додають теплу воду з встановленим значенням рН, що має температуру, при якій відбувається ферментація [22]. Для коригування значення рН в гідролізат додають і кісткове

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						54
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



борошно з раніше отриманої партії, і кальцій і азот, з апаратів подачі кісткової муки та азоту [22].

Відділення жиру проводять у безперервному або періодичному режимі в залежності від кількості жиру в переробляється сировина [36]. Особливо важливою відмітною ознакою цього винаходу є те, що може бути виділена дуже чиста високоякісна жирова фракція, оскільки поділ може здійснюватися безперервно протягом всього процесу таким чином, що виділений жир не піддається окисленню більше, ніж необхідно, коли ліпопротеїни розкладаються шляхом гідролізу [22, 36]. Проведення гідролізу в лужних умовах також сприяє підтримці якості жиру на високому рівні, особливо в тому випадку, коли для корекції рН використовують азот [22].

Транспорт через мембрани базується на принципах осмосу чинним таким чином, що через мембрану проникають лише молекули певного розміру, переважно менше 10000 дальтон [22]. В результаті концентрації не фільтрованих вільних амінокислот і пептидів в якості побічного продукту утворюється дистильована вода і її частина повертається на фільтр приблизно при тому ж тиску, при якому знаходиться гідролізат з іншого боку мембрани [22, 33]. Після отримання гідролізату фільтрату наступна стадія його концентрації. Ця операція призначена для видалення води перед проведенням процесу сушіння, в результаті чого повністю використовується ємність стадії сушки або досягається бажаний для рідкого продукту рівень концентрації входять амінокислот і пептидів [22].

Після концентрації продукт піддається сушці, однак отриманий матеріал може мати форму рідини або знаходиться в проміжному стані [35]. Сушка підвищує стійкість продукту при зберіганні і спрощує процеси логістики та обробки [22]. Спосіб сушіння продукту є важливим фактором для кінцевого результату. Сушку / грануляцію здійснюють у дві стадії. Спочатку продукт сушать до стану порошку в розпилювальній сушарці або аналогічному пристрої, що передбачає стадію охолодження, після чого продукт піддають грануляції [22]. Грануляцію здійснюють таким чином, що гранулят «конструюється» в

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						55
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

результаті підтримки системи порошок / продукт в стані інтенсивного руху з використанням засобів механічного псевдоожиження [22]. Потім на отриманій масі розпилюють концентрат / гідролізат, в результаті чого відбувається поступове утворення грануляту [33]. Всі перераховані операції реалізуються в безперервному процесі.

Отже, ферментативний спосіб отримання білкових гідролізатів з рибних відходів є найбільш перспективним для вивчення і застосування через специфічність каталізаторів і вихідної сировини, що вимагають індивідуального підбору умов проведення реакції в залежності від їх виду [22].

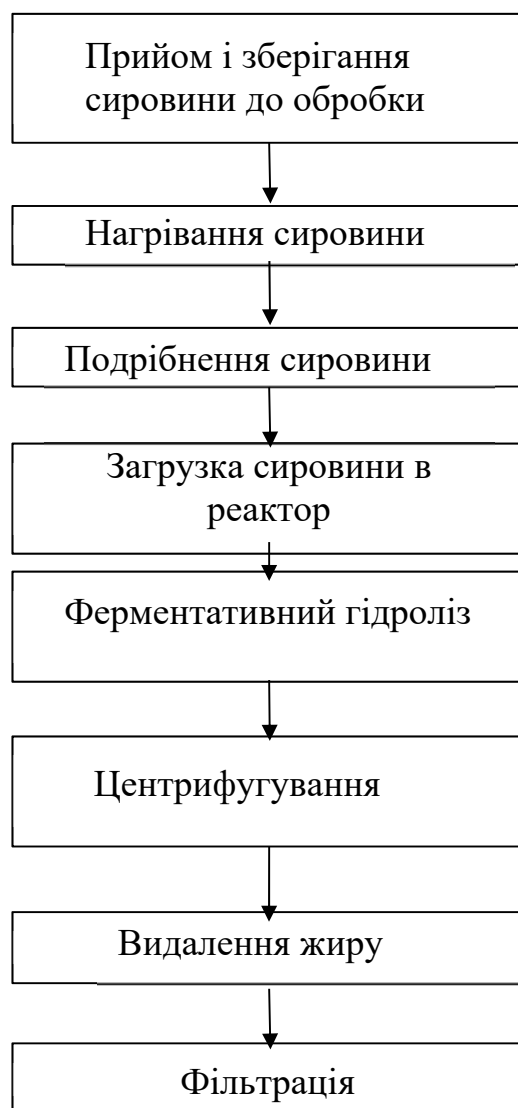


Рис.4.1. Схема переробки рибних відходів із застосуванням технології ферментативного гідролізу [22, 32]

Найбільша біохімічна активність у більшості ферментів проявляється лише при певних концентраціях водневих іонів, і, навіть, незначні відхилення рН середовища від цього оптимуму послаблює активність ферменту, або змінює характер його дії [32]. Наприклад, оптимум рН для типових протеолітичних ферментів: трипсин - 7,8-9,5; пепсин - 1,5-2,5. Крім того, для кожного ферменту існує певний температурний оптимум (для амілази - 50 °С, пепсину і трипсину - 37 °С). При нагріванні до 70 °С більшість ферментів інактивуються, а при 100 °С вони руйнуються [32].

Переваги гідролізу полягають в селективності каталізу речовин, високій ефективності, так як даний спосіб дозволяє отримувати готовий продукт з складом амінокислот, що є ідентичним амінокислотному складу вихідної сировини [32]. Збереження амінокислот забезпечується, в тому числі, «м'якими» умовами протікання реакції ( $t_0 = 35 \div 50$  °С, рН близькі до нейтральних значень, тиск атмосферний) [32].

Ще одна істотна перевага полягає в тому, що при ферментативному гідролізі руйнується структурна зв'язок білка з жиром, що дозволяє з легкістю відокремити останній, щоб провести подальшу сушку білка без побічних продуктів і додаткових маніпуляцій [22, 32].

Ферментативний гідроліз - найкращий спосіб гідролізувати рибну шкіру, не втрачаючи поживної цінності [33]. Цей спосіб є найбільш поширеним особливо в харчовій та фармацевтичній промисловості, оскільки процес гідролізу не залишає в своїх продуктах залишкових органічних розчинників або токсичних хімікатів [33].

Ферментативний гідроліз вважається найбільш природним методом гідролізу білка [31]. Ця методика застосовується протягом століть, особливо в країнах Східної Азії, як традиційний метод збереження. Ферментація не тільки підсилює смак та смак їжі, але й підвищує її харчову цінність [34].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						57
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Під час процесу ферментації біоактивні пептиди вивільняються під дією як мікроорганізмів, так і ендогенних протеолітичних ферментів [22]. Кілька досліджень продемонстрували біологічну активність різних морських продуктів, таких як тайський ферментовані креветки паста, креветки побічних продуктів, кальмарів місо, і різноманітні традиційні ферментовані рибні продукти [35].

Етапи ферментативного гідролізу включають підготовку субстрату, вибір правильного ферменту, вимірювання ступеня ферментативного гідролізу, гомогенізацію та нагрівання для інактивації ендогенних ферментів, гідролізу та припинення ферментативної реакції [22].

### **1.3. Характеристика живильного середовища для подальшого культивування**

#### **1.3.1. Характеристика біологічного агента**

*Bacillus subtilis* - надзвичайно різноманітний вид бактерій, здатний рости в різних середовищах, включаючи шлунково-кишкові тракти тварин. Порівняльний геномний аналіз на основі мікроматриці виявив, що представники цього виду також мають значне різноманіття геному. Ідентифікація генів, специфічних для штаму, може пояснити, як *B. subtilis* настільки широко адаптувався [46]. Ця мета - виявлення екологічно адаптивних генів - незабаром може бути реалізована з невідкладним вивільненням декількох нових послідовностей геномів *B. subtilis* [55]. Починаючи з цієї захоплюючої нової ери порівняльної геноміки *B. subtilis*, ми розглядаємо те, що на сьогодні відомо про екологію та еволюцію цього виду [46].

*Bacillus subtilis* можна виділити з безлічі середовищ - наземних та водних - завдяки чому цей вид є всюдисущим і широко пристосованим для росту в різних середовищах біосфери [47]. Однак, як і всі представники роду *Bacillus*, *B. subtilis*

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						58
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

здатний утворювати високостійкі сплячі ендоспори у відповідь на позбавлення поживних речовин та інші екологічні навантаження . Ці спори легко потрапляють у повітря і розсіюються вітром [47]. Таким чином, спори можуть мігрувати на великі відстані, висаджуватися в заданому середовищі, але ніколи там не проростати [55]. Зважаючи на те, що традиційні методи виділення *B. subtilis* вимагають, щоб організм був у своїй споровій формі, немає гарантії, що коли штам виділяється з певного середовища, він фактично зростає у цій місцевості. Таким чином, на сьогоднішній день питання про те, де росте *B. subtilis*, досі залишається без відповіді [47].

Використання флуоресцентних антитіл для розрізнення вегетативної та спорової форм *B. subtilis* у різноманітних зразках ґрунту виявило, що організм найчастіше знаходився у своїй вегетативній формі, коли він асоціювався з гниючим органічним матеріалом [55]. Подальша підтримка ідеї, що *B. subtilis* може вести сапрофітний спосіб життя, що впливає з експериментів, в яких спори були прищеплені штучним ґрунтовим мікрокосмом, насиченим фільтрованою стерилізованою розчинною органічною речовиною, витягнутою з ґрунту [48]. За цих умов спори не тільки проростали, але і вегетативні клітини розмножувались протягом кількох днів, поки вони знову спорульовані, ймовірно, у відповідь на виснаження поживних речовин. Незабаром після проростання клітини утворили зв'язані ланцюги, які рухалися на поверхні незалежно від джгутиків . Цікаво, що подібний перехід до росту, як ланцюжки, що зв'язуються, спостерігається на ранніх стадіях розвитку біоплівки в лабораторних умовах [48].

Сьогодні ми опиняємося в золотому періоді геноміки завдяки все більш сприятливим методам генерування, збирання та аналізу великої кількості інформації про послідовність [49]. Нам більше не потрібно покладатися лише на ізоляційну географію, поведінку в лабораторії чи анекдотичні звіти, щоб зібратися. картина екології виду. Крім того, ми можемо досліджувати наявні або відсутні гени в будь-якому штамі, що цікавить [50]. Ідентичність білків, за якими

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						59
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

прогнозується кодування в геномі організму, може багато чого розкрити про спосіб життя організму та місця проживання, де він мешкає [50].

Послідовність геному *B. subtilis* 168 дала багато уявлень про спосіб життя організму [51]. Відповідно до думки, що бактерія не є збудником хвороби, не було знайдено генів, що кодують відомі фактори вірулентності. Цікаво, що геном кодував численні шляхи утилізації рослинних молекул, підкріплюючи думку про те, що цей вид тісно асоціюється з рослинами [52]. Одне спостереження кинуло виклик давній вірі, що *B. subtilis* - це зобов'язаний аеробний одяг; було виявлено гени, що кодують респіраторну нітрат-редуктазу [53]. Це дозволяє припустити, що *B. subtilis* повинен мати можливість вирощувати анаеробно, використовуючи нітрати замість кисню як акцептора електронів [48]. Анаеробний ріст *B. subtilis* у присутності нітратів було продемонстровано експериментально. Відкриття того, що *B. subtilis* дійсно може зростати анаеробно, ще більше підтримує думку про те, що вегетативне життя в основному анаеробних ШКТ тварин є здійсненим [48].

Організми бактерій, виділені методом обприскування ґрунту, відповідають за вироблення антибіотиків, пептидів та ферментів.. Найбільше антибіотичну активність спостерігалось у *Bacillus subtilis* МН-4. Найбільш оптимальна активність відбувається при температурі 38-45 градусів Цельсія та базовому рН 8 [54]. Гліцерин - оптимальне джерело вуглецю, а L-глутамінова кислота - оптимальне джерело азоту. Було визначено, що антибіотик бацитрацин впливає лише на грампозитивні бактерії [56]. Інші антибіотики, які утворюють *Bacillus subtilis*, - це поліміксин, складнідин, субтилін та мікобактеріал. Поліміксин діє на грамнегативні бактерії, тоді як складнідин має більш широкий спектр [56].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						60
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

### 1.3.2. Обґрунтування вибору складу поживного середовища для подальшого культивування

Для культивування бацилів використовують чотири варіанта середовища. Першою є синтетична середа, що міститься (г / л): (  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,3;  $\text{NaCl}$  – 0,3;  $\text{KCl}$  – 0,3;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  – 0,001;  $\text{CaCO}_3$  – 5,0; глюкозу – 10,0; глицерофосфат кальцію – 2,0; дистильовану воду – 1л; рН – 7,1 [57].

Поряд з цим середовищем використовують також - м'ясопептонний бульйон, пептонне середовище, а також мелясу.

Пептонне середовище включає (г/л): пептон – 10,0;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{NaCl}$ –3,0; глюкоза – 5,0; дистильовану воду –1л; рН 7,2- 7,4 [57].

Середовище з мелясою містить (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  -0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,3;  $\text{NaCl}$ -0,3;  $\text{CaCO}_3$  -3,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  – 0,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,5; меласса – 20,0; кукурузний екстракт – 1,0; рН 6,8-7,2. Середовище з меляси включає стерильну водопровідну воду [57].

Показано, що при культивуванні *B. subtilis* на досліджених зразках різного складу бактерії виявили неоднакову родову активність. На МПБ та пептонному середовищі, багатих за вмістом органічних з'єднань, споглядали найінтенсивніше зростання бацилл. Максимальний вміст клітин в середовищі після 48 годин культивування складало  $(7,9 \pm 1,1) \cdot 10^9$  і  $(3,3 \pm 0,4) \cdot 10^9$  КУО / мл, відповідно [57]. Однак компоненти даних середовищ дорогостоячі для напрацювання біомаси клітин у виробничих умовах.

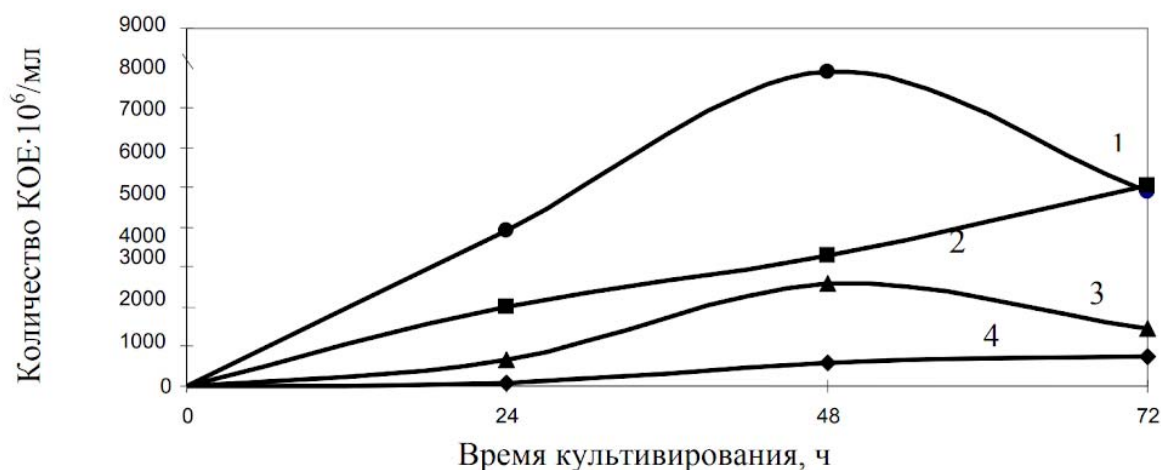


Рис.2.1. Зростання *B. subtilis* IMB B-7023 на різних типах поживних середовищ. 1 - МПБ (питома швидкість росту - 0,32 год<sup>-1</sup>); 2 - пептонне середовище (0,29 год<sup>-1</sup>); 3 - середовище з м'ясою (0,25 год<sup>-1</sup>); 4 - середовище з гліцерофосфатом (0,15 год<sup>-1</sup>) [57].

Дешевшою для застосування у виробництві є середовище з м'ясою, яку бактерії можуть використовувати в якості основного джерела вуглецю і енергії [57]. При зростанні на цьому середовищі протягом 48 год чисельність життєздатних бацил становила  $(2,6 \pm 0,4) \cdot 10^9$  КУО / мл [57]. За показником чисельності бактерій за 48 год вирощування на досліджуваних середовищах можна скласти шкалу інтенсивності їх накопичення: МПБ > середа з пептоном > середовище з м'ясою > середа з гліцерофосфатом [57]. Таким чином, показано, що навколишнє середовище з м'ясою (як більш дешева) є прийнятною для подальшої оптимізації та використання в виробничих умовах [57].

Дослідження ростової активності бацил на середовищах з різним вмістом м'яси

(10,0; 20,0; 40,0; 60,0 г / л) проводили в періодичних умовах протягом 48 год.

Показано, що склад оптимізованого живильного середовища (г / л) [57]:

м'яса - 15,0

кукурудзяний екстракт - 2,0

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  - 0,2



$\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,2

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,3

$\text{NaCl}$  - 0,3

$\text{CaCO}_3$  - 3,0

pH - 6,8 - 7,2.

Оптимізована одній з вищенаведених складу призначена для вирощування *B. subtilis* IMB B-7023 в лабораторних та виробничих умовах і дає можливість отримати за 24 год культивування високий вихід життєздатних клітин [57] .

### 1.3.3. Обґрунтування вибору технології культивування

*Bacillus subtilis* це грам-позитивна аеробна ґрунтова бактерія, як і всі представники роду, утворює ендоспори [46]. Вперше була описана в 1835 році Еренбергом як *Vibrio subtilis*, в 1872 році була перейменована Коном на *Bacillus subtilis* та стала типовим видом роду [46]. В українській літературі трапляється назва «сінна паличка» через те, що культури накопичення цього мікроорганізму отримують з сінного екстракту [48]. Є продуцентом пептидів та ферментів (амілази, протеази), що отримуються промислово. Також ця бактерія — модельний організм для дослідження грам-позитивних бактерій.

Для виробництва пептидів білкових гідролізатів поверхневим і глибинним способами використовують відселекціоновані штами *Bacillus Subtilis*. Мікроорганізм культивували в живильному середовищі при 37 ° С протягом 24 годин при постійному струшуванні при 150 об/хв [22]. Приблизно 10 мкл свіжої бактеріальної культури інокулювали в 125 мл колбу хінтона, що містить 5 мл поживного середовища, і давали їй рости протягом 24 годин при постійному струшуванні при 250 об/хв. Вміст колби пропорційно масштабували до 100 мл і давали зростати ще протягом 24 годин [58].

До біосинтезу бактерії переносили у ферментер для нарощування біомаси, який містив поживне середовище. Бактерії давали зростати у ферментері при 37 ° С протягом 24 годин зі швидкістю перемішування та аерації, встановленою при

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						63
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

450 об/хв та 3 об/хв відповідно. Потім біомасу мікроорганізмів завантажують до виробничого ферментера. Ферментація тривала протягом 24 годин [58].

Тобто це спосіб регенерації суміші пептидів і амінокислот, мінералів і масла або жиру з білкових матеріалів, переважно походять з водних організмів. Продукт хаактеризується високою концентрацією пептидів (42%) в поєднанні з гідролізованим колагеном [22]. Відомі способи відрізняються від винаходу зовсім іншим методом отримання риб'ячих білків, які також присутні в різних фракціях, що містять пептиди і амінокислоти. Технологічні умови також суттєво відрізняються від відомого рівня техніки, і в цьому винаході виключаються використанням екзогенних ферментів [22]. Крім цього, як зазначено в цитованому вище матеріалі, високоякісне масло / жир морських тварин в цьому винаході отримують в результаті розробки спеціального методу [22, 58].

Процес являє собою природну ферментацію білків з метою отримання сухих кінцевих продуктів або рідких продуктів, що містять різні кількості пептидів і вільних амінокислот [22]. Такий спосіб забезпечує отримання готових продуктів, які необов'язково містять 5-100% вільних амінокислот. Розглянутий продукт не містить алергенів і слідів ДНК [58]. Продукт містить дуже невеликі кількості жиру і біологічних мікронутрієнтів, зазвичай менше 0,1% [22]. Спосіб відповідно забезпечує отримання продукту, надзвичайно корисного як культурального середовища для всіх видів культур, включаючи клітини вищих організмів, так і насичена кормова добавка [22]. Даний процес дає можливість проведення процесу без використання гідроксиду натрію, присутність якого створює проблеми при виробництві амінокислот і пептидів в промисловому масштабі [22]. Співвідношення води може варіювати в більшій мірі, ніж у відомих способах, при цьому в більшому масштабі може змінюватися масовий відсотковий вміст вільних амінокислот [22]. У порівнянні з відомими способами в цьому винаході використовують як подрібнений, так і неподрібнений матеріал, при цьому використовують природні ферменти, вже присутні в сировині [22]. Таким чином, використовуються ендogenous ферменти сирого білкового матеріалу, що забезпечує проведення гідролізу більш стійким і менш дорогим

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						64
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

способом. Крім цього, умови повинні безпосередньо адаптуватися до активності ендогенних ферментів [22].

Активні ферменти мають спеціальним очисним дією. Оскільки вони утримуються на фільтрі, такі ферменти впливають на нефільтровані білки і пептиди [22]. Ферменти сприяють розпаду таких матеріалів і тому мають більший строк служби в порівнянні з традиційними способами фільтрації, до теперішнього часу використовуються в відомих процесах гідролізу [22]. Все це забезпечує значні переваги в тому, що стосується вартості, терміну служби та ефективності фільтрів, якості продуктів і ступеня утилізації системи і процесу [22].

## **1.4. Характеристика обладнання**

### **1.4.1. Описання та обґрунтування обраного ферментера**

Спосіб культивування обрано періодичне за типовим технологічним рішенням.

При періодичному методі культивування весь об'єм поживного середовища засівають чистою культурою і вирощування ведуть в оптимальних умовах відповідний час до накопичення потрібної кількості цільового продукту [59]. Оскільки культивування ведеться на поживному середовищі (в стаціонарних умовах), який не відновлюється клітини весь час знаходяться в умовах які змінюються [57]. Спочатку мікроорганізми мають усі поживні речовини, а потім поступово їх кількість зменшується і починається отруєння шкідливими продуктами обміну [60]. В зв'язку з цим культура в своєму розвитку проходить чотири фази росту і розмноження, на протязі яких змінюються розміри клітин, швидкість розмноження, морфологічні і

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						65
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

фізіологічні властивості біологічних агентів з використанням поживних середови [59].

Важливим є застосування періодичного культивування з підживленням. Його перевага полягає в додаванні через певні проміжки часу порцій свіжого живильного середовища, що дозволяє підвищити продуктивність культури, в порівнянні зі звичайною періодичною ферментацією [22, 57].

Недоліком періодичного культивування являється нераціональні витрати часу на проходження всіх чотирьох стадій розвитку культури, причому період самої активної життєдіяльності – фаза логарифмічного росту – займає невелику частину виробничого циклу [61].

Невід’ємною частиною підготовчих процедур біотехнологічних підприємств є проведення робіт санітарно-гігієнічного призначення [60]. Основним спрямуванням санітарної підготовки виробництва є мінімізація кількості контамінантів у складі учасників виробничого процесу [61]:

- в поживному середовищі;
- в технологічному аераційному повітрі;
- на поверхнях обладнання, яке контактує з поживним середовищем (культуральною рідиною);
- забезпечення чистоти на виробничих ділянках де чистота та асептика можуть вплинути на якісні показники продукції.

В біотехнології застосовують різні способи стерилізації, але при цьому контамінуюча мікрофлора повинна бути повністю зруйнована або видалена [59]. Процес дії на контамінанти при якому вони руйнуються або повністю віддаляються називають стерилізацією [57]. Можна сказати і так «Стерилізація – сукупність фізичних, хімічних, механічних способів позбавлення від вегетативних та спорових форм мікроорганізмів» [59].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						66
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

В біотехнології застосовують три групи способів стерилізації [61]:

- механічні;
- хімічні;
- біологічні.

Видалення і деструкція мікробів може бути досягнуте різними способами [61]. Деструкція, що приводить до повної втрати життєздатності мікроорганізмів, є надійним способом стерилізації. Після закінчення кожного циклу біосинтезу у посівному і основному/виробничому ферментерах і видаленню з них культуральної рідини ферментери відкривають (відкривають оглядовий люк і миють гарячою водою з брандспойта, миючого пристрою (гідромонітору), очищаючи від залишків біомаси [59, 61].

Послідовність носить стандартний характер і як правило включає такі роботи. Барботер продувають повітрям [62]. Після огляду, а при необхідності і ремонту ферментер знову миють водою, закривають люк і разом з іншою апаратурою стерилізують гострою та глухою насиченою парою [57]. Перед стерилізацією апаратуру і комунікації промивають водою температурою 100 °С з магістрального трубопроводу [57]. Як приклад можна розглянути стерилізація ферментаційного обладнання та іншого обладнання гострою парою (пара, що безпосередньо контактує з об'єктом стерилізації)  $t = 110^{\circ} \text{C}$ , за тиску 0,2 МПа упродовж 1,5 год з подальшим охолодженням упродовж 3,5 год [57]. Пара подається як в середину апарату, так і в прилеглі комунікації, так і в сорочку обладнання [57]. В процесі стерилізації водяна пара не утворює шкідливих для процесу біосинтезу речовин і основними продуктами, що утворюються після стерилізації є вторинна водяна пара та конденсат [61]. У випадку санітарної підготовки для промислового культивування біологічного агента перед початком проведення процесу стерилізації, відбувається процес миття обладнання за допомогою механізованої мийної установки фірми «Керхер» (Германія) [61]. На всмоктуючій стороні насоса температура миючої рідини

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						67
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

складає 50–60 °С, на нагнітальній стороні після нагріву в теплообміннику 90–95 °С [61].

Бак з миючим розчином і регулюючим вентилем для подачі розчину, насос, що створює тиск струменя, необхідний для миття і очищення бака з фільтром, куди стікає миюча рідина із зливного отвору апарату, змонтовані на пересувному візку [61]. Рідина для миття може бути використана багато разів завдяки циркуляційному контуру і фільтрації через вбудований фільтр. Перед стерилізацією апаратуру і комунікації промивають водою температурою 100 °С з магістрального трубопроводу [59]. Після миття відбувається процес стерилізації обладнання за допомогою гострої пари ( $T=100^{\circ}\text{C}$ ,  $P=0,2$  МПа, час проведення 1,5 години з подальшим охолодженням впродовж 3,5 годин) та розчину каустичної соди 40%. Після процесу стерилізації відбувається перевірка на герметичність обладнання, з'єднань та комунікацій [50]. Тетрахлорметан закачують в герметично закрите обладнання та комунікації до тиску 0,5 МПа та за допомогою датчика - течешукача галогенопохідних проводять огляд всіх з'єднань обладнання та комунікацій [50]. Особливу увагу приділяють фланцевим з'єднанням та ущільненню кришок місткісного обладнання [51]. У випадку виявлення нещільних з'єднань проводять розбору та профілактичне ущільнення обладнання та комунікації. Для з'єднань проводять їх підтягування та перепаковування, а для обладнання підтягування кришок, або з'єднань і в випадку необхідності заміну ущільнюючих прокладок люків та кришок [51].

В якості ущільнюючого матеріалу використовують термостійку гуму, пароніт, фторопласт [52]. Головна вимога до апаратів - збереження стерильності, тому вони повинні бути герметичними, всі лінії трубопроводів повинні бути доступні для обробки гарячою парою [52]. Робочий об'єм ферментера (біореактора) зазвичай не перевищує 7/10 загального обсягу [59].

Будь-який біотехнологічний процес умовно реалізують в три основних етапи [51]. Перший - підготовчий (предферментація), на якому виконуються всі

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						68
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

підготовчі роботи (підготовка і стерилізація поживних речовин субстрату для культивування мікроорганізмів-продуцентів), напрацювання (накопичення) використовуюваного продуцента, стерилізація і підготовка основного обладнання (біореактора - ферментера) [51].

Другий етап - основний (ферментація) включає в себе стадію культивування відповідного мікроорганізму-продуцента і накопичення цільового продукту (у нашому випадку – ітаконової кислоти) [55].

На третьому етапі (постферментації) - відбувається виділення і очищення цільового продукту [55]. Характерною особливістю конструкції промислових ферментерів є те, що до них відносяться сталі апарати з механічними перемішувальними пристроями номінальним об'ємом від 0,01 до 100 м<sup>3</sup> у середовищах з динамічною в'язкістю не більше 200 Па\*с [60].

Для культивування продуцента використовується ферментер з об'ємом 50 м<sup>3</sup>, коефіцієнт заповнення ферментера складає 0,75. Стерилізація є невід'ємним компонентом загальної підготовки обладнання, яка принципове значення для асептичних виробництв [61].

Стерилізація ферментаційного обладнання проводиться за промивки апарату водою з подальшим контактом з гострою парою,  $t = 130^{\circ}\text{C}$ , за тиску 0,2 МПа протягом 1,5 год з подальшим охолодженням протягом 3,5 год [62]. Після закінчення стадії підготовки ферментеру, наступною метою є завантаження поживного середовища та культури продуцента в стерильних умовах. Оптимальна температура поживного середовища  $38^{\circ}\text{C}$  для продуцента [63].

Процес вирощування продуцентів потребує перемішування та аерації. Аерування культури проводиться на основі розрахунків і відбувається при подачі стерильного підігрітого повітря через спеціальні пристосування - барботери. Клітини мікроорганізмів суспендовані в рідині і знаходяться в підвішеному стані [56].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						69
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Культивування відбувається протягом 48- 72 годин з моменту внесення культури за температурного режиму в діапазоні від 38 до 45 °С. Апарати з механічним перемішуванням - найбільш поширені конструкції в сучасній мікробіологічній промисловості [52]. Для неперервного перемішування використовують турбінну мішалку [64]. Всі форми і види ферментативних систем створюються, маючи основною метою забезпечення однакових умов для всіх компонентів вмісту реактора. У ферментерах рідке середовище містить необхідний субстрат для забезпечення зростання організмів і утворення потрібного цільового продукту [66].

Для створення оптимальної біореакторної системи необхідно точно дотримуватися наступної генеральної лінії [67]:

- Біореактор повинен бути сконструйований так, щоб виключити потрапляння забруднюючих мікроорганізмів, а також забезпечити збереження необхідної мікрофлори. Обсяг суміші, що культивується, повинен залишатися постійним, тобто так щоб не було витоків або випаровування вмісту.
- Рівень розчиненого кисню повинен підтримуватися вище критичних рівнів аерування культури аеробних організмів.
- Параметри зовнішнього середовища, такі, як температура, рН і т. П., повинні постійно контролюватися.
- Культура при вирощуванні повинна бути добре перемішуватись.

В сучасних умовах на підприємствах застосовують, в основному, глибинний спосіб культивування так як в порівнянні з поверхневим культивуванням глибинний спосіб має ряд переваг [59]: Більша питома площа контакту; Є більш компактним; Більш ефективний та продуктивний. У біотехнологічних виробництвах в залежності від особливостей процесу застосовують різноманітні ферментери [55].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						70
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



У апаратах з комбінованим підведенням енергії здійснено підведення енергії до газової фази для аерації і до рідкої фази для перемішування [51]. Ферментер є циліндричною посудиною, забезпечений механічною мішалкою і барботером, який встановлюється, як правило, під нижнім ярусом мішалки. Процес вирощування *Bacillus Subtilis* потребує перемішування та аерації за типовою технологічною схемою [22, 55].

За способом перемішування культуральної рідини ферментери бувають [64]: Ферментери з пневматичним перемішуванням; Ферментери з механічними перемішувачами; Ферментери, в яких перемішування здійснюється за допомогою енергії рідинної фази [51].

Апарати з механічним перемішуванням мають механічну мішалку, що складається з центрального вала і лопатей різної форми. Аерація може здійснюватися шляхом барботажа. Розбризкування повітря у вигляді дрібних бульбашок сприяє механічний вібратор, встановлений поруч з барботером. Апарати з пневматичним перемішуванням [55].

Перемішування і аерація посилюються за допомогою обертових дисків з отворами, встановлених поблизу барботера, або за допомогою придонних пропелерів [54]. Класичний ерліфтний апарат доповнений дифузоровим, нижній обріз якого знаходиться над барботером. Можливі варіанти подачі повітря як у внутрішній, так і в зовнішній по відношенню до дифузора обсяг середовища [63].

Апарати з циркуляційним перемішуванням містять пристрої (насоси, ежектори), що створюють спрямований струм рідини по замкнутому контуру. Насос для циркуляції культуральної рідини може бути сусідами з барботером (поєднання пневматичного і циркуляційного перемішування) [54].

*Оптимальним, є ферментер з підводом енергії до газової та рідкої фаз. До цієї групи апаратів відносяться найбільш поширені ферментери з механічними перемішувачами та барботером [55].*

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						71
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Перевагою механічного типу перемішування є його простота, ефективність та відносна економічність. В якості перемішуючого пристрою будуть слугувати турбінні мішалки. Ферментер має бути обладнаний тепловою сорочкою для підтримання температурного режиму культивування [65].

Ферментери з механічним перемішуванням барботажного типу широко застосовуються для стерильних процесів вирощування мікроорганізмів - продуцентів біологічно активних речовин [61]. Ферментатор розрахований для роботи під надлишковим тиском 0,25 МПа і стерилізації при 130 ... 140 ° С. Ферментер такого типу являє собою вертикальний апарат циліндричної форми, виготовлений зі сталі Х18Н10Т або біметалу з еліптичними кришкою і днищем [69]. Конструкція апарату дозволяє створити найкращі умови для виробництва: він оснащений мішалками, трубками для подачі і виведення повітря, пристроями, що забезпечують рівномірність концентрації розчинних речовин і колоїдних частинок в середовищі [67].

Перегородки зазвичай вбудовуються у ферментери всіх розмірів для запобігання вихору і поліпшення ефективності аерації [66]. Вони являють собою металеві смуги приблизно на одну десяту діаметра ферментерів і закріплені радіально до стінок. Культивування продуценту буде проводитись глибинним періодичним способом [66]. Це дасть змогу вберегти культуральну рідину від контамінації та полегшить процеси виробництва та виділення цільового продукту, оскільки, штаб росте на рідкому поживному середовищі, потребує постійної аерації, та синтезує амінокислоту у стаціонарній фазі росту [64]. Основними вимогами до ферментерів є можливість проведення процесу культивування продуценту в асептичних умовах при інтенсивних аерації та масообмінних процесах в середині біореактора [68].

Для забезпечення високого значення тепломасообміну в середині ферментера повинен бути встановлений перемішуючий пристрій. Однак, при виборі мішалки слід враховувати і фізіологічні особливості штама продуцента [69]. Є декілька типів перемішуючих пристроїв, проте, задля забезпечення

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						72
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

високих показників тепломасопередачі оптимальним варіантом є мішалки турбінного типу. Вони забезпечують інтенсивне перемішування культуральної рідини по всьому об'єму ферментера. Їхня конструкція є простою, а затрати на енергію невисокі [69].

За типом потоку рідини, що створює мішалка, виділяють мішалки, що утворюють тангенціальну, радіальну та осьову течію [68]. При тангенціальній течії рідина в апараті рухається паралельно площині обертання мішалки. Найгірше перемішування – коли швидкість обертання мішалки дорівнює швидкості обертання рідини [68]. При високих швидкостях лопатей мішалок, що створюють тангенціальну течію, утворюється воронка навколо вала [68].

Для запобігання цього явища в апарат поміщають перегородки для відбивання, що сприяє утворенню місцевих закруглень рідини. Конструкція мішалок має сприяти прямій енергії, що створює турбулентні пульсації [60]. Чим більшу швидкість має мішалка і чим менша її довжина, тим більша частина енергії перетворюється в турбулентність. Найкращий варіант – це створення багатоярусних мішалок [62]. При цьому кращим є розміщення мішалок нижнього приводу, оскільки, при цьому звільняється верхня частина ферментера для ремонту, знижується навантаження на апарат, знижується металоємність, проте ускладнюється ущільнення вала [62].

Наявність теплової сорочки дозволить встановлювати і тримати певні температурні режими при культивуванні. Це відбувається за рахунок подачі у сорочку холодної води [61]. Так як продуцент є мезофілом, для його вирощування і відповідно до розрахунків оптимальною температурою буде 38 °С.

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						73
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

### 1.5. Висновки до розділу

- Для культивування було обрано штам мікроорганізму виду *Bacillus subtilis*, завдяки перевагам у здатності до накопичення пептидів, простоті культивування, та здатності виділення ферментів пептидаз.
- Було обрано поживне середовище з м'яси для кращого накопичення біомаси обраного виду мікроорганізму.
- Згідно запропонованих технологій, було обрано технологію ферментативного гідролізу за участі мікроорганізмів та ендогенних ферментів, оскільки даний метод характеризується простотою, дешевизною, якістю продукції в порівнянні з іншими технологіями.
- Було обрано рибну сировину як джерело пептидів.
- Був обраний апарат ферментера з еліптичною кришкою та еліптичним днищем з перемішуючим пристроєм турбінного типу та барботером, завдяки своїй простоті конструкції, а також можливістю інтенсифікації масообміну.

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						74
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## РОЗДІЛ 2. БІОХІМІЧНІ ОСНОВИ ТЕХНОЛОГІЧНОГО ПРОЦЕСУ

### 2.1. Схема перебігу процесів

Білок і пептиди розщеплюють ферменти, що об'єднані в підклас пептидгідролаз. Їх називають також протеазами, протеолітичними ферментами [70]. Процес відноситься до способів отримання безбілкових продуктів, що містять вільні амінокислоти і короткі пептиди. Це спосіб отримання пептидів з вмістом жиру менше 0,5 мас.% з сировини, що містить білок, в якому сировину подрібнюють і піддають гідролізу в присутності ендогенних ферментів з нагріванням, перемішуванням і далі піддають розділовій обробці, що включає коагуляцію білкових залишків. Пептиди, отримані таким способом, мають вміст вільних амінокислот, що становить 30-60 %, а жиру менш як 0,5 % [70]. Виділення пептидів з гідролізної суміші відбувається через фільтр з молекулярною масою пептидів менше 10000 дальтон. Спосіб дозволяє отримувати амінокислоти / пептиди, що не містять алергени і сліди ДНК [22].

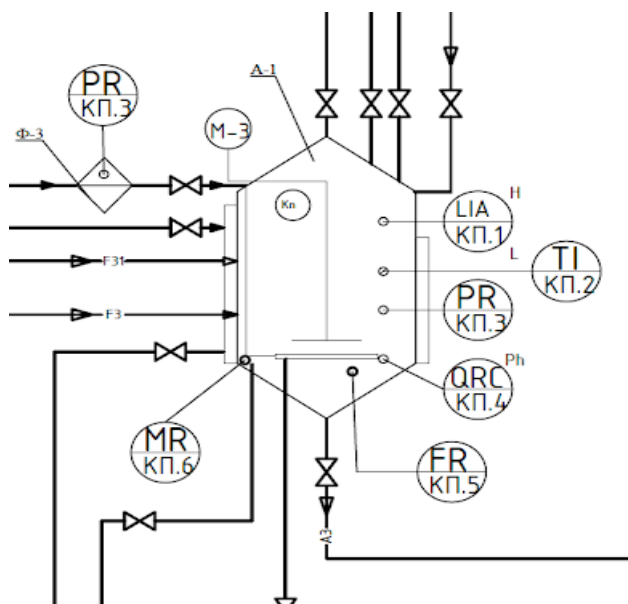


Рис.1.1. Схема перебігу процесів виробництва пептидів білкових гідролізатів [22].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 2. Біохімічні основи технологічного процесу	Стадія	Арк.	Акрушіє
Розроб.	Демків А.Р.							
							75	132
Керів.	Левтун І.І.					КПІ ім. Ігоря Сікорського,ФБТ		
Затверд.								

«Ендогенні ферменти» відносяться до ферментів, які існують всередині білкового продукту, на відміну від «екзогенних» ферментів, які є сторонніми ферментами, які додають в білкову сировину в ході традиційного гідролізу [22]. Одним з прикладів «екзогенних» ферментів є «Diterzyme», який представляє собою бактеріальну протеазу, яку отримують регульованою ферментацією *Bacillus*. «Ендогенні» ферменти також використовується для позначення ферментів, екстрагованих з інших природних ферментних матеріалів або сировини, переважно з тварин, риб [22].

Виробництво пептидів гідролікатів передбачає подрібнення рибопродуктів або відходів їх обробки, змішування з водою, під час якого відбувається гомогенізація, нагрівання суміші, під час якої відбувається виділення ендогенних ферментів, додавання препарату біологічного агенту, який споживає біомасу, виробляючи пептиди шляхом свого метаболізму, і так само виділяючи і ферментні компоненти необхідні для процесу, ферментацію - ферментативний гідроліз, фільтрацію і сушку, причому сировину і воду змішують у співвідношенні 2: 1-1: 1 і нагрівають до температури 38 -45 °С, а ферментацію проводять з використанням екзогенного ферменту, протосубтиліна [22, 71].

Основною реакцією, що каталізується протеолітичними ферментами, є гідроліз пептидного зв'язку в молекулах білків і пептидів [70]:

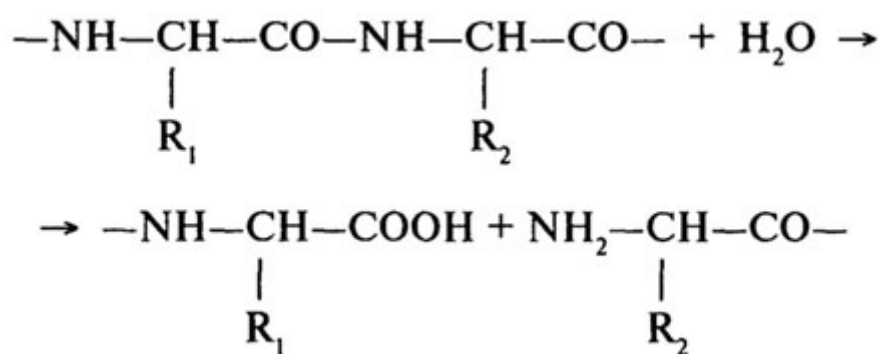


Рис. 1.2. Гідроліз пептидного зв'язку в молекулах білків і пептидів [70].

Протеази поділяють на ендо- і екзопептидази. Ферменти першої групи (ендопептидази) можуть гідролізувати глибинні пептидні зв'язки і розщеплювати молекулу білку на дрібніші фрагменти; ферменти другої групи (екзопептидази) не можуть гідролізувати пептидні зв'язки, що знаходяться в

середині ланцюга, і діють або з карбоксильного, або з амінного кінця ланцюга, відщеплюючи послідовно одну за іншою кінцеві амінокислоти. У зв'язку з цим *екзопептидази* піділяють на амінопептидазу, карбоксипептидазу і дипептидазу [71].

*Амінопептидаза* каталізує відщеплення N-кінцевих амінокислот:

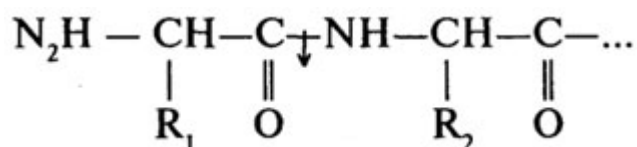


Рисунок.2.1.3. Відщеплення N-кінцевих амінокислот [71].

*Карбоксипептидаза* каталізує відщеплення C-кінцевих амінокислот.

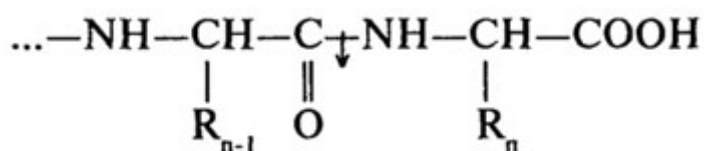


Рис.1.4. Відщеплення C-кінцевих амінокислот [71].

*Дипептидаза* гідролізує дипептиди.

Дипептидилпептидази і пептидилдипептидази каталізують відщеплення дипептидов відповідно від N- кінця і від C-конца поліпептидного ланцюга [70].

В той же час ендопептидази (протеїнази) поділені на підгрупи, починаючи з підкласу 3.4.21, в першу чергу на основі каталітичного механізму (будови активного центру); особливості специфічності використовуються тільки для ідентифікації індивідуальних ферментів в межах підкласу [71]:

- серинові протеїнази, в активному центрі яких функціонує залишок серину і гістидину;
- тіолові (цистеїнові) протеїнази, містять в активному центрі SH- групу залишку цистеїну;
- кислі (карбоксильні) протеїнази, в активному центрі містять COOH- групу залишку аспарагінової кислоти;
- металопротеїнази, містять в активному центрі метал, необхідний для прояву їх каталітичної активності.

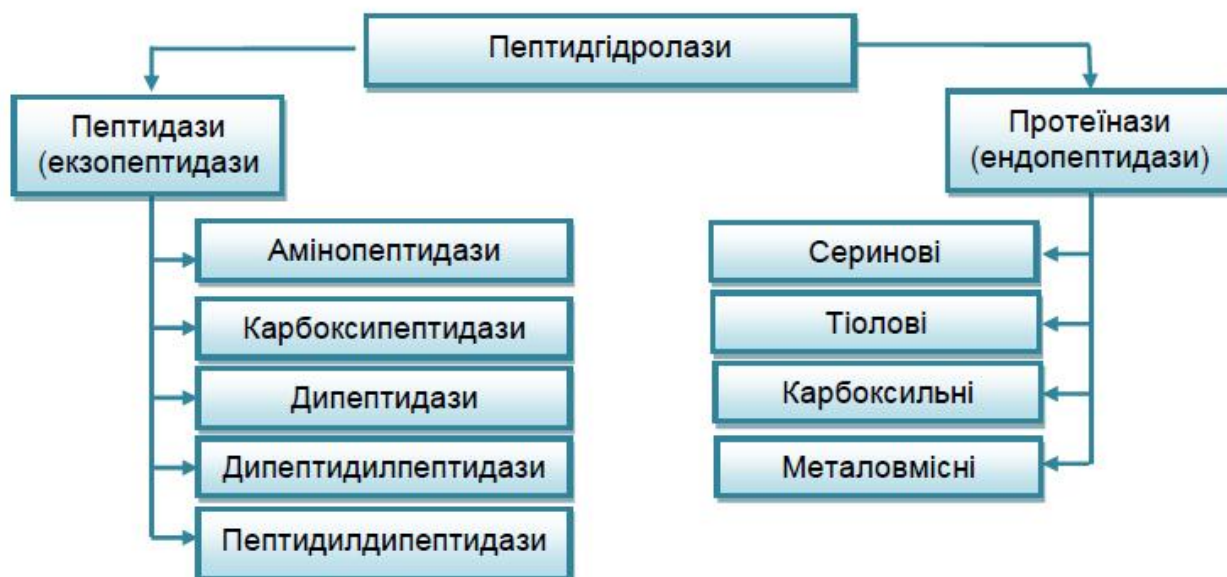


Рис.1.5. Схема класифікації пептидгідролаз [71].

Швидкість ферментативного гідролізу білкових сполук визначається наявністю в них пептидних зв'язків, специфічних для дії ферменту, а також просторовою структурою субстрату [71].

На доступність пептидних зв'язків гідролізу впливають вторинна, третинна і четвертинна структура білків. Білки можуть мати один або два типи впорядкованих вторинних структур ( $\alpha$ -спіральну і  $\beta$ -складчасту), що представлених в різних поєднаннях і охоплюють більш менш значну частину поліпептидного ланцюга [71]. У впорядкованих структурах певні ділянки поліпептидного ланцюга екрановані і недоступні дії ферментів. Чим вище ступінь впорядкованості структури, тим менш білок схильний до протеолізу.

Третинна структура білку, його геометрична форма визначає співвідношення експонованої і екранованої частин молекули (тобто доступною і недоступною протеолізу) [70].

Найменш доступні для протеолізу є молекули з найменшою питомою поверхнею, тобто що наближаються за формою до кулі [70].

Четвертинну структуру мають білкові молекули, що складаються з субодиниць. Останні можуть бути асоційовані за рахунок ковалентних, іонних і водневих зв'язків. Асоціація субодиниць знижує відносну величину експонованої частини молекули, збільшує її конформаційну стабільність за



рахунок внутрішньомолекулярних взаємодій. Асоційовані молекули є менш доступними для дії ферментів, ніж дисоційовані [71].

Денатурація білків супроводжується розгортанням поліпептидного ланцюга, демаскуванням раніше екранованих груп. Знімаються обмеження доступності субстрату, що зумовлені вторинною, третинною четвертинною структурою. Денатуровані білки гідролізуються швидше і повніше ніж нативні [71].

## 2.2. Характеристика кінцевого продукту.

Процес проводять [22]:

- за відсутності будь-яких домішок, таких як хлороформ, що запобігає небажаному бактеріальний зараженню;
- без додавання гідроксиду натрію;
- при можливості гарячою чи холодною регенерації безбілкового і стерильного масла / жиру морських тварин;
- з можливістю регулювання спектра вільних амінокислот і пептидів в кінцевому продукті в обраному виді сировини для процесу в результаті підбору спеціальних сировинних матеріалів;
- з можливістю регулювання результатів процесу, що стосуються амінокислотного і пептидного складу, за допомогою використання потрібних технологічних параметрів, таких як температура і рН;
- без додавання кислоти;
- при гнучкій комбінації різних видів сировини;
- в результаті використання адаптованої стадії концентрації для виділення фракцій продукту;
- при використанні безперервного процесі ферментного розкладання;
- без коагуляції білків і / або пептидів при використанні кислоти;
- в результаті класифікації отриманих пептидів за розміром;

					ЕКБ.БЕ6127ДП	Арк.
						79
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

В результаті даних процесів отримують продукт, що містить мінерали і мікронутрієнти біологічного походження [22, 72].

Тобто це спосіб регенерації суміші пептидів і амінокислот, мінералів і масла або жиру з білкових матеріалів, переважно походять з водних організмів. Продукт хаактеризується високою концентрацією пептидів (42%) в поєднанні з гідролізованим колагеном [22, 72].

Склад	на 12 г
Калорії	45 ккал
Натрій	35 мг
Білок	11 г
Гідролізовані рибні пептиди	12 г

Таб.2.1. Склад продукту на 12 г [72].

Відомі способи відрізняються від винаходу зовсім іншим методом отримання риб'ячих білків, які також присутні в різних фракціях, що містять пептиди і амінокислоти [22]. Технологічні умови також суттєво відрізняються від відомого рівня техніки, і в цьому винаході виключаються використанням екзогенних ферментів [22]. Крім цього, як зазначено в цитованому вище матеріалі, високоякісне масло / жир морських тварин в цьому винаході отримують в результаті розробки спеціального методу [22].

Процес являє собою природну ферментацію білків з метою отримання сухих кінцевих продуктів або рідких продуктів, що містять різні кількості пептидів і вільних амінокислот [22]. Такий спосіб забезпечує отримання готових продуктів, які необов'язково містять 5-100% вільних амінокислот. Розглянутий продукт не містить алергенів і слідів ДНК. Продукт містить дуже невеликі кількості жиру і біологічних мікронутрієнтів, зазвичай менше 0,1% [22]. Спосіб відповідно забезпечує отримання продукту, надзвичайно корисного як культурального середовища для всіх видів культур, включаючи клітини вищих

організмів, так і насичена кормова добавка. Даний процес дає можливість проведення процесу без використання гідроксиду натрію, присутність якого створює проблеми при виробництві амінокислот і пептидів в промисловому масштабі [22, 72]. Співвідношення води може варіювати в більшій мірі, ніж у відомих способах, при цьому в більшому масштабі може змінюватися масовий відсотковий вміст вільних амінокислот. У порівнянні з відомими способами в цьому винаході використовують як подрібнений, так і неподрібнений матеріал, при цьому використовують природні ферменти, вже присутні в сировині [72]. Таким чином, використовуються ендогенні ферменти сирого білкового матеріалу, що забезпечує проведення гідролізу більш стійким і менш дорогим способом. Крім цього, умови повинні безпосередньо адаптуватися до активності ендогенних ферментів [22].

Активні ферменти мають спеціальним очисним дією. Оскільки вони утримуються на фільтрі, такі ферменти впливають на нефільтровані білки і пептиди [22]. Ферменти сприяють розпаду таких матеріалів і тому мають більший строк служби в порівнянні з традиційними способами фільтрації, до теперішнього часу використовуються в відомих процесах гідролізу. Все це забезпечує значні переваги в тому, що стосується вартості, терміну служби та ефективності фільтрів, якості продуктів і ступеня утилізації системи і процесу [22].

В методі описується регенерація масел / жиру, а також твердих матеріалів. Одним з твердих речовин, які можуть утворюватися за допомогою способу за даним винаходом, є гідроксиапатит [22]. Гідроксиапатит використовують, наприклад, в біохроматографії і інших процесах сепарації біологічних об'єктів, таким чином, ця речовина є комерційно привабливим побічним продуктом процесу [22].

## РОЗДІЛ 3. ТЕХНОЛОГІЧНА ЧАСТИНА

### 3.1. Сировина та матеріали

Шкура риб є сполучною тканиною, істотною особливістю якої, що відрізняє її від інших видів, є значне кількісне переважання міжклітинної речовини над клітинними елементами [73].

Міжклітинний матрикс складається з волокнистих компонентів, а простір між ними заповнений основною речовиною, що містить глікопротеїни [73]. Масова частка води в шкірі прісноводних риб коливається від 73,01% для сазана до 76,84% для толстолобика. Масова частка білка варіює від 16,5% для товстолобика до 18,59% у щуки; жиру - від 4,79% для щуки до 7,39% у сазана; золи, а, отже, мінеральних речовин, від 1,38% для товстолобика до 1,73% для сазана [73]. Так як шкура товстолобика та інших прісноводних риб має досить пухку структуру по порівняно з іншими зразками, її масова частка білка становить 16,5%, велика частина якого (90,73%) припадає на лужно розчинні, до яких відноситься колаген, було прийнято рішення вибрати саме цей об'єкт (шкуру товстолобика як основну частину сировини, включно з усіма іншими видами риби) як джерело колагенових білків [73]. Сировина для описуваного процесу може складатися з білого матеріалу, переважних риб, рибопродуктів, моллюсков, ракообразних і побічних продуктів, рибної / риболовецької промисловості, наприклад, вихідних та інших водних організмів, наявних як у пресі, так і в соляній воді [73].

Роздільні види сировини можуть використовуватись окремо або у вигляді продуктів поєднання, що містять «ферментний матеріал» та «білковий матеріал» [22].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 3. Технологічна частина	Стадія	Арк.	Акрушіє
Розроб.		Демків А.Р.						
							82	132
Керів.		Левтун І.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		
Затверд.								

«Ферментний матеріал» представляє собою сир, що містить ендогенні ферменти в достатній кількості і задовольняє якість [22].

«Білий матеріал» представляє собою сир, не містить ендогенних ферментів, які задовольняють добротні якості в достатній кількості, і вони в остаточному підсумку мають бути повністю заповнені фермерським продуктом для того, щоб забезпечити проведення фермерської обробки [22].

У деяких випадках фермерський матеріал може бути тотожним до найрізноманітніших матеріалів [22].

В техніках описується поєднання відходу та білого матеріалу в соотношении 1: 1. Способи, розкриті в теперішньому винаході, дають можливість змінити це відповідно до темпу, щоб досягти бажаних результатів у відношенні кінцевого продукту [22].

Сировина задовольняє встановленим вимогам ДСТУ 8029:2015 Риба та рибні продукти та ГОСТ 23041-78 Мясо и продукты мясные, що належить до вихідних продуктів для напівпродукції харчових продуктів [22]. Раніше сировину класифікували у відповідності до законодавства та термінології як відходи. Завдяки хорошій логістиці та технічно програмістам в даному випадку, коли сировина може бути визнана харчовим продуктом. Це можливість здійснювати виробництво в промисловому масштабі і використовувати продукт у харчовій та / або фармацевтичній промисловості [22].

### **3.2. Опис технологічного процесу**

#### **ДР 1. Санітарна підготовка виробництва**

##### **ДР 1.1. Підготовка приміщення**

Огляд устаткування персоналом до проведення технологічного процесу та експлуатації, відповідно до вимог регламенту.

					<b>ЕКБ.БЕ6127.ДП</b>	Арк.
						83
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Всі мийні, дезінфікуючі розчини і суміші готує блок стерилізації, що призначений за наказом відповідальної особи цеху/підрозділу/ділянки.

### **ДР 1.2. Підготовка обладнання**

Через технологічне обладнання пропускають миючі засоби. Вузли обладнання вимиваються в розчині миючого засобу при температурі 70-80°C, час - 3 год. Подається розчин каустичної соди, гостра пара  $t=110^{\circ}\text{C}$ ,  $P=0,2\text{ МПа}$ , вода питна, тетрахлорметан рідкий. Відпрацьовані рідини поступають до ЗВ 19.

### **ДР 1.3. Мийка обладнання**

Обробку ферментера проводять розчином каустичної соди після кожного культивування, за температури 20°C. Потім реактор заповнюють водою до необхідного рівня. Розчин каустичної соди перемішують барботажним повітрям упродовж 30 хв. Відпрацьована вода і розчин каустичної соди йде до ЗВ 19.

### **ДР 1.4. Стерилізація обладнання**

Стерилізацію проводять шляхом подання гострої пари при температурі близько 130°C, тиску 0,2 МПа, протягом 30 хв, КУО<2. Після стерилізації утворений конденсат подається до ЗВ 19.

### **ДР 2. Підготовка повітря для аерації**

Аби підтримувати рівномірний розподіл живильних речовин у ферментері необхідно застосовувати систему перемішування. Буває механічна, циркуляційна та барботажна системи. За використання ферментеру найчастіше здійснюють перекачування суспензії з високою швидкістю, для чого до ферментеру подається барботажне повітря, яке попередньо очищається для запобігання забруднення середовища іншими видами мікроорганізмів та інгібіторами росту клітин.

					<b>ЕКБ.БЕ6127.ДП</b>	Арк.
						84
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

### **ДР 2.1. Збір повітря з атмосфери**

Процес збору повітря проводять за допомогою виносних труб, що знаходиться за межами повітрорудної станції, з точкою забору 4-6 м вище рівня землі при температурах від -20 °С до 45 °С. Повітря поступає на очищення до ДР 2.2.

### **ДР 2.2. Попереднє очищення повітря**

Повітря очищається крізь волокнистий фільтр, що затримує пил, механічні часточки. Фільтрувальним матеріалом є тканина Петрянова (ФП) з максимальним діаметром часток, що затримуються 1,5 мкм, з максимально допустимою температурою 60°С ефективністю очищення 98%. Механічні частки йдуть на ЗВ 19. Повітря поступає на доочищення на ДР 2.3.

### **ДР 2.3. Очистка на індивідуальних фільтрах**

Ретельне очищення повітря відбувається за допомогою фільтра НЕРА, ефективність якого 99,97% , який встановлено у фільтр Канал-ФПК типу F5 (тонка очистка повітря). Фільтр дозволяє проводити очищення від часток діаметром до 0,3 мікрон. Повітря поступає на ТП 9.

### **ДР 3. Підготовка води**

Якість води в системах водопостачання може відрізнятися за вмістом неорганічних, органічних речовин, жорсткістю, солоністю, складом та концентрацією мікроорганізмів тощо, в залежності від місця знаходження виробництва. Вода нагрівається до 45-58°С. Вміст карбонатів та фосфатів може призвести до осадження в культуральному середовищі живильних елементів таких як Fe, Cu, Mo тощо, що негативно впливатиме на швидкість росту культури. Тому, раціональним є використання артезіанських свердловин глибиною від 90 м.

					<b>ЕКБ.БЕ6127.ДП</b>	Арк.
						85
ЗМН.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Для очищення води пропонується установка зворотного осмосу ВодІнТех-М (Росія) з продуктивністю 40000 л/год ( $40 \text{ м}^3/\text{год}$ ), і потужністю до 45 кВт . За її використання видаляються органічні та неорганічні забрудники, мікроорганізми та солі  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ ,  $\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$ ,  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$  і  $\text{MgCl}_2$ , що обумовлюють жорсткість води. Вода поступає на ТП 9. Здійснюється контроль технічний , хімічний і мікробіологічний.

#### ДР 4. Отримання посівного матеріалу

Метою ДР 7 є забезпечення виробничого процесу культивування максимально якісною і достатньою кількістю виробничої культури процесу для утворення максимально якісної кількості кінцевого продукту. Для виробництва пептидних гідролізатів глибинним способом використовують *B.Subtilis*. Посівний матеріал розмножується в пробірках з агаризованим середовищем (сусло-агар), а потім в колбах на рідкому поживному середовищі. Тривалість кожної стадії 48-144 год, оптимальна температура культивування  $38-45^\circ \text{C}$ , оскільки культура є мезофільною. При цьому здійснюється технологічний та мікробіологічний контроль.

#### ДР 5. Нарощування культури біологічного агента

Поживне середовище готують безпосередньо у бродильному апараті – ферментері (Фе-1) для підрощування. Поживне середовище для підрощування культури доцільно засівати попередньо (за 10-12 год) замоченими в середовищі з розрахунку 0,75 г культури на 1  $\text{м}^3$  середовища, яке містить мелясу з кінцевою концентрацією 15%, кукурудзяний екстракт - 2,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  - 0,2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - 0,2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  - 0,3;  $\text{NaCl}$  - 0,3;  $\text{CaCO}_3$  - 3,0; воду - до 1 л. Інкубацію проводять з аерацією (0,25 об'єму повітря

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						86
ЗМН.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



на 1 об'єм рідини) і сильним перемішуванням. Важливим фактором є повітряний режим в «бродильній камері» [80, с. 91]. Підтримується рН в межах - 7-8,5 [8, с. 90]. Біомаса поступає на ТП 9.

Склад оптимізованого живильного середовища (г / л):

м'яса - 15,0; кукурудзяний екстракт - 2,0;  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  - 0,2;  $KH_2PO_4$  - 0,2;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  - 0,3; NaCl - 0,3;  $CaCO_3$  - 3,0; рН - 6,8 - 7,2.

## **ДР 6. Підготовка сировини**

### **ДР 6.1. Стерилізація сировини**

Процес стерилізації сировини необхідна для захисту від контамінації іншими біологічними агентами, стадія стерилізація є необхідною.

Стерилізація проводиться 25 хвилин, при тиску - 0,2 МПа, та температурі - 130°C в автоклаві А-12. В рівні техніки вказується, що для запобігання зростанню мікроорганізмів додають хлороформ, проте в цьому способі цей матеріал переважно не використовується. Для знищення небажаних мікроорганізмів застосовується УФ-опромінення, що не призводить до коагуляції ферментів. Слід також враховувати, що в промисловому масштабі хлороформ переважно не використовують.

### **ДР 6.2. Подрібнення сировини**

Сировина - відходи переробки риби, в тому числі нутрощі, шкура, луска, кістки, плавники, голови прокачується з резервуара через дробильну систему подрібнювача (П), яка забезпечує бажане подрібнення матеріалів,  $d=10\text{мм}$ . Дроблення забезпечує велику робочу поверхню для ферментів і більш швидке виділення сировинних ферментів. Подрібнена сировина поступає на ТП 9.

### **ДР 6.3. Нагрівання сировини**

					<b>ЕКБ.БЕ6127.ДП</b>	Арк.
						87
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Поступає сировина з ДР 6.2. Проводять нагрівання подрібненої сировини до температури в інтервалі ( $T_e$ ) 40-62 ° С. Сировина, доданий в ферментер (Фе-2), може зберігатися в одній або декількох буферних ємностях після розмелювання. Для білкового і ферментного матеріалів можуть використовуватися різні ємності.

#### **ДР 7. Попередня холодна регенерація масла з сировини**

Перша система масло / жир може виділятися з сировини до початку процесу ферментації. В даному випадку, наприклад, може використовуватися холодна регенерація масла. Поступає сировина з ДР 6.3.

Холодна регенерація масла включає наступні стадії:

1. Центрифугування в горизонтальній роторній центрифугі деканційного типу (Прмц13) сировини і розділення рідких і твердих частинок на дві різні фракції;
2. Виділення масла з рідкої фази, через масляний фільтр (Ф3) і до резервуару для регенерації масла перед стадією гідроліза (Р5) ;
3. змішування твердої фази і важкої фази зі стадії поділу і перекачування суміші в ферментер (Фе-2);
4. додаткову обробку масляної фази зі стадії поділу з утворенням готового, прийняттого для споживача продукту, що не потребує додаткової очистки для придбання якості харчового продукту.

Матеріали можна перекачувати через теплообмінник (Т2) в бродильний чан (Фе-2). Бродильний чан (Фе-2) також може використовуватися для нагрівання, якщо така операція не проводиться в теплообміннику до перекачування матеріалів.

Контроль умов в ферментері (Фе-2) здійснюють безперервно, автоматично або шляхом відбору зразків. Введення різних добавок здійснюють таким чином, що підтримуються якомога більше стабільні умови ферментації в рамках інтервалів значень, які є оптимальними для виробленого продукту.

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						88
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## **ДР 8. Підготовка реагентів**

### **ДР 8.1. Дозування реагентів в прилади подачі**

Кістне борошно, азот та кальцій сухий окремо поступають в прилади подачі даних речовин (За18, Зк19) для підтримки рН для проходження якісного процесу.

## **ТП 9. Культивування B.Subtilis 232 у ферментері - ферментативний гідроліз пептидів.**

Метою ТП 9 є забезпечення виробничого процесу відповідними умовами культивування виробничої культури з метою її ефективного росту з утворенням потрібного, максимально якісного та в достатній кількості кінцевого продукту. Наприкінці експонентної фази росту бактеріальна культура від ДР5 передається з посівного в основний апарат. Сировину у вигляді білкових і ферментних матеріалів закачують в ферментер. У суміш додають воду з температурою 45-58 ° С в кількості 10-40% л з встановленим значенням рН, що має температуру, при якій відбувається ферментація. Також подається сировина з ДР 6.3. Для коригування значення рН в гідролізат можна додавати як кісткове борошно з раніше отриманої партії, так і кальцій і азот, з апаратів подачі кісткової муки та азоту. Ферментаційне середовище бактеріальної культури містить 15% цукру меляси (склад солей той же, що і при поверхневому методі)/ Необхідною умовою є використання лужних ферментів, проте їх кількість зменшена за рахунок вмісту ендогенних ферментів. Для цього необхідно, щоб в ході ферментації підтримували  $\text{pH} > 7,00$ . Інтервал робочих значень рН становить 7,00-8,50. Оптимальна ферментація здійснюється при рН 7,60-8,20. Протягом ферментації здійснюється інтенсивне перемішування та аерація середовища. Наприкінці процесу концентрація гідролізату досягає 85 г./л. Біосинтез пептидів протікає найбільш інтенсивно при засіві виробничого ферментатора культурою, що знаходиться в кінці логарифмічної фази зростання, що відповідає приблизно 30

					<b>ЕКБ.БЕ6127.ДП</b>	Арк.
						89
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

год росту. Процес утворення пептидів в ферментері протікає при перемішуванні і аерації середовища при температурі 38-46 °С протягом 72 год. Гідролізат поступає до ТП 10.

Для підтримки постійних умов ферментації в бродильному чані (Фе-2) регулярно контролюють кількість аміносвязанного азоту, кількість загального білка і рН. При необхідності в ході процесу додають білковий і ферментний матеріал. Гідролізат безперервно прокачують через систему видалення бажаних амінокислот і пептидів.

### **ТП 10. Видалення твердих частинок**

#### **ТП 10.1. Просіювання твердих частинок**

Метою ТП 10 є видалення з гідролізату твердих частинок і негідролізованих білків, які можуть повертатися на стадію ферментативного гідролізу;. Даний винахід передбачається, що тверді частинки розміром вище 1 мм можуть безперервно або періодично видалятися з гідролізату за допомогою ситової фільтраційної системи (Фм15).

#### **ТП 10.2. Центрифугування гідролізату**

Ситова система може не використовуватись або розташовуватись в байпасній лінії, якщо система відстійників декантаторів (Прт9) на такій технологічній стадії забезпечує видалення всієї твердої фази, або в тому випадку, коли продукт АЗ - потік, що включає білки, ферменти, масло / жир, пептиди і вільні амінокислоти, що обробляється в даній ситуації, не містить твердих частинок, придатних для просіювання.

#### **ТП 10.2. Флотація гідролізату**

Потім видалені частинки - потік, що включає тверді частинки, відокремлені за допомогою центрифуги (Прт9) чи сита (Фм15), можуть відділятися відповідно до їх щільності за допомогою процесу флотації (Фр10) на флотаційному резервуарі для розділення білків і гідроксиапатиту, внаслідок чого не

					<b>ЕКБ.БЕ6127.ДП</b>	Арк.
						90
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

гідролізовані білкові залишки можуть повертатися в бродильний чан (Фе-2) до потоку А3.  $P=0,3$  МПа. Білки спливають і можуть механічно або вручну зніматися зверху. Більш важкий матеріал збирається в донній частині бродильного чану.

### ТП 11. Декантація гідролізату

Метою ТП 11 є очищення пептидного гідролізату від жиру для отримання максимальної кількості якісного продукту. В дану операцію включаються наступні апарати: деканційна центрифуга Ц4, сепараційний пристрій для відділення масла Прмц13, мембранний фільтраційний модуль Фм15. Відстійник декантатор може використовуватися в даній системі до масляного сепаратора і мембранного фільтру. Ця операція призначена для спрощення відділення жиру від пептидного гідролізату і проводиться, наприклад, в трифазному сепараторі. В результаті цього далі знижується навантаження на наступний мембранний фільтр.

Сепаратор не здатний працювати в оптимальному режимі, якщо вміст твердих частинок дуже велика, що має на увазі наявність великого обсягу шламової фази. Відстійник є пристрій, призначений для відділення твердих частинок, щільність яких більша за густину рідини, частиною якої вони є. Такі частинки являють собою головним чином білки, що піддаються відділенню, і в зв'язку з цим бажано направляти їх назад в бродильний чан для додаткової ферментації до ТП 9.

Відокремлений твердий матеріал може спливати відповідно до тих же принципів, що використовуються в фільтраційній системі. При необхідності може використовуватися флотаційний пристрій. Відстійник декантатор може не використовуватися або відключатися від системи, якщо вже згаданий ситовий пристрій забезпечує бажану сепарацію, або в тому випадку, коли повинні стати предметом обробки продукти не утворюють білкових залишків, які можуть вилучатися за допомогою відстійника.

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						91
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## ТП 12. Поділ гідролізату на фракції

Метою ТП 12 є відділення гідролізату від жирової фракції. Пептидний гідролізат піддають поділу з використанням трифазного сепаратора, придатного для відділення легшої жирової фракції від гідролізату. Відділення жиру проводять у безперервному або періодичному режимі в залежності від кількості жиру в сировині, що переробляється. Жир до ПВ. Гідролізат до ТП 13. Особливо важливо є те, що може бути виділена дуже чиста високоякісна жирова фракція, оскільки поділ може здійснюватися безперервно протягом всього процесу таким чином, що виділений жир не піддається окисленню більше, ніж необхідно, коли ліпопротеїни розкладаються шляхом гідролізу. Проведення гідролізу в лужних умовах також сприяє підтримці якості жиру на високому рівні, особливо в тому випадку, коли для корекції рН використовують азот.

## ТП 13. Мембранна фільтрація

Метою ТП 13 є очищення пептидного гідролізату для отримання максимальної кількості якісного продукту. Процес передбачає перекачування гідролізату через пристрій, переважно забезпечене мембранним фільтром Ф5, діючим таким чином, що через мембрану проникають лише молекули пептидів певного розміру, переважно менше 10000 дальтона, а присутні активні ферменти руйнують білки, обложені на мембранному фільтрі.

Фільтрацію проводять таким чином, що гідролізат прокачується через безліч трубчастих мембран або проходить через безліч плоских мембран.

Робочий тиск до 9 бар, продуктивність  $8 \text{ м}^3/\text{хв}$ .

Транспорт через мембрани базується на принципах осмосу. В результаті концентрації нефільтрованих вільних амінокислот і пептидів в якості побічного продукту утворюється дистильована вода і її частина повертається на фільтр

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						92
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

приблизно при тому ж тиску, при якому знаходиться гідролізат з іншого боку мембрани до ТП 13. Також відбувається повернення порцій гідролізату, що не проникає через мембранний фільтр по на стадію гідролізу ТП 9. Підтримуючи більш низьку концентрацію амінокислот і пептидів з проникного боку мембран, може бути здійснене проникнення через них під дією сил осмосу. Потік гідролізату уздовж поверхні мембрани механічно очищає її від осаду білкових залишків, більших, ніж ті, що здатні проникати через мембрани. Гідролізат до ТП 14.

#### **ТП 14. Концентрація гідролізованого фільтрату**

Після отримання гідролізованого фільтрату настає стадія його концентрації. Мета цієї операції призначена для видалення води перед проведенням процесу сушіння, в результаті чого повністю використовується ємність стадії сушки або досягається бажаний для рідкого продукту рівень концентрації амінокислот і пептидів, що входять з ТП 13.

Для зазначеної мети найкраще підходить процес дистиляції типу вакуумного випаровування для видалення бажаних пептидів і амінокислот з рідини, в якій вони розчиняються в ході мембранної фільтрації. Для випарювання застосовують апарат з природною циркуляцією та виносною гріючою камерою [2, 12, 13]. Цю конструкцію рекомендовано використовувати на даному виробництві тому, що: конструкцію можна швидко розібрати та зібрати [12]; осад можна видаляти механічним способом [2]; має місце легкий доступ до внутрішньої поверхні гріючих труб: забезпечується висока швидкість процесу випарювання [12]. Вакуумний випарник K16 концентрує рідина при низькій температурі, в результаті чого не відбувається пошкодження пептидів / амінокислот. Необхідною умовою для оптимальної мембранної фільтрації на ранніх стадіях є здатність концентраційного пристрою повертати в систему найбільш чистий дистилят. В цьому випадку реалізується оптимальний осмос через мембрани. На стадію поступає гідролізат, вакуум, насичена водяна пара ( $P=0,3$  МПа). Випаровування здійснюється в температурному інтервалі 50-85 ° С

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						93
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

при пониженому тиску який складає 0,045 Мпа, до концентрації 38-40%. .  
 Оптимальний температурний інтервал становить 65-70 ° С. Дистилят на ТП 9.  
 Конденсат на ТП 15.1 і 15.2. Вторинна водяна пара до ПВ. Вода дистильована до  
 ТП 9. Існує небезпека того, що температура конденсату занадто висока для його  
 проходження назад на фільтр або повернення в бродильний чан. В такому  
 випадку слід використовувати теплообмінник, знижує температуру до бажаного  
 значення.

## **ТП 15. Сушіння конденсату**

### **ТП 15.1. Сушка в сушарці**

При необхідності, після концентрації продукт може бути підданий сушці,  
 однак отриманий матеріал може мати форму рідини або знаходитися в  
 проміжному стані. Сушка С17 підвищує стійкість продукту при зберіганні і  
 спрощує процеси логістики та обробки. Спосіб сушіння пептидного продукту є  
 важливим фактором для кінцевого результату.

Сушку / грануляцію здійснюють у дві стадії. Спочатку продукт сушать до  
 стану порошку в розпилювальній сушарці або аналогічному пристрої, що  
 передбачає стадію охолодження, після чого продукт піддають грануляції.  
 Температура висушування становить 120-140°C, w=7-9%. Конденсат до ЗВ.  
 Порошок продукту до ТП 15.2.

### **ТП 15.2. Гранулювання**

Грануляцію здійснюють таким чином, що гранулят «конструюється» в  
 результаті підтримки системи порошок / продукт в стані інтенсивного руху з  
 використанням засобів механічного псевдооживлення. Потім на отриманій маси  
 розпилюють концентрат / гідролізат з ТП 14, в результаті чого відбувається  
 поступове утворення грануляту. П=35-40 об/хв. Всі перераховані операції

					<b>ЕКБ.БЕ6127.ДП</b>	Арк.
						94
<b>Змн.</b>	<b>Арк.</b>	<b>№ докум.</b>	<b>Підпис</b>	<b>Дата</b>		



реалізуються в безперервному процесі. До моменту закінчення процесу грануляції через / крізь гранулят пропускають сухий холодне повітря.

В результаті цього матеріал стає твердішим і більш розчинним. Після цього гранулят просівають і відбирають бажані фракції. Занадто дрібні частинки повертають на додаткову грануляцію, тоді як частинки розміром вище номінального піддають подрібнення і знову просівають. Новоутворені дрібні частинки повертають на стадію грануляції. Пептиди, отримані даним способом становлять 50-60 мас.%, вміст жиру становить менш як 0,5 мас.%, а вміст солі становить менше 1 мас.%.

#### **ТП 16. Стандартизація продукту.**

Залежно від важливості й рівня виробництва на продукцію можуть розроблятися різні види стандартів. Особливі вимоги, котрі підлягають обов'язковому дотриманню всіма суб'єктами підприємницької діяльності, висуваються до продукції і тих її параметрів, які можуть загрожувати здоров'ю та життю людей, їх майну, не забезпечують достовірність і єдність вимірювань, технічні характеристики виготовлення й експлуатації тощо.

#### **ПМТ 17. Пакування, маркування, транспортування.**

ДСТУ 24508-80 поширюється на харчові концентрати і встановлює загальні вимоги до упаковки, маркування, транспортування і зберігання.

#### **ПВ 18. Переробка відходів**

На дану стадію поступають продукти, що мають здатність до використання чи переробки, вони транспортуються на полігони для утилізації чи нейтралізації.

#### **ЗВ 19. Знешкодження відходів**

На дану стадію поступають продукти, що не можуть більше використовуватись, транспортується на ліквідацію.

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						95
ЗМН.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

### 3.3. Контроль виробництва

На кожній стадії даного виробництва здійснюється мікробіологічний та технічний контроль [22]. Також технологічна лінія виробництва оснащена контрольно вимірювальними приладами з метою контролю умов виробництва, стану апаратів, та контролю процесу всього виробництва. Перелік контрольно вимірювальних приладів наведено у додатку [74].

Технічним контролем називається перевірка дотримання технічних вимог до якості продукції на всіх стадіях її виготовлення, а також виробничих умов і чинників, що забезпечують необхідну якість [22, 74]. Об'єктами технічного контролю є матеріали і напівфабрикати, що надходять на підприємство зі сторони, продукція підприємства як у готовому вигляді, так і на всіх стадіях її виробництва, технологічні процеси, знаряддя праці, технологічна дисципліна і загальна культура виробництва [75]. Технічний контроль має забезпечувати випуск продукції, що відповідає вимогам конструкторсько-технологічної документації, сприяти виготовленню продукції з найменшими витратами часу і засобів, надавати вихідні дані і матеріали, що можуть бути використані з метою розробки заходів щодо підвищення якості продукції та скорочення витрат [75].

Технічний контроль — це комплекс взаємозалежних і проведених відповідно до встановленого порядку контрольних операцій, більшість з яких є невід'ємною й обов'язковою частиною виробничого процесу і тому покладається на робітників, що виконують відповідну виробничу операцію [74]. Разом з тим з метою забезпечення випуску продукції належної якості і попередження втрат у виробництві багато контрольних операцій виконується бригадами, майстрами і спеціальним персоналом — працівниками заводського відділу технічного контролю (ВТК) [75].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						96
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Загальні принципи раціональної організації технічного контролю полягають у такому [75]:

— технічний контроль має охоплювати всі елементи і стадії виробничого процесу [75];

— техніка, методи й організаційні форми контролю повинні цілком відповідати особливостям техніки, технології й організації виробництва [75];

— ефективність раціональної організації технічного контролю в цілому й окремих її елементів має бути обґрунтована належними економічними розрахунками [75];

— система контролю має забезпечувати чіткий і обґрунтований розподіл обов'язків і відповідальності між окремими виконавцями та різними підрозділами підприємства [75];

— система контролю має використовувати ефективні методи статистичного контролю мотивації [75].

Особливо швидко і сильно уражаються мікроорганізмами продукти, які в своєму складі містять багато вологи – продукти харчування, різні парфюмерно-косметичні засоби, а також будівельні матеріали (ґрунтовки, шпаклівки, фарби, добавки і т.д.) [22].

Основою профілактики мікробного забруднення готового продукту є мікробіологічний моніторинг (мікробіологічний контроль) виробництва, який дає можливість виробникові приймати вірні технологічні та управлінські рішення [74].

Обов'язковою умовою забезпечення якості продукції є підтримання високого рівня гігієни і санітарії на виробництві: своєчасне і в повному обсязі проведення поточних і генеральних прибирань, мийка та дезінфекція приміщень, технологічного обладнання, інвентарю, тари і т.д. Для цього слід використовувати сучасні ефективні і, одночасно, безпечні для об'єктів обробки, персоналу та навколишнього середовища миючі та дезінфікуючі засоби, що володіють комплексом спеціальних функціональних властивостей відповідно до конкретними завданнями і умовами застосування [74].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						97
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3.4. Матеріальний баланс

Використано			Отримано		
Стадія	Назва сировини,матеріалів та напівпродуктів	Кількість,кг	Стадія	Назва кінцевого продукту/напівпродукту, відходів та втрат	Кількість, кг
Стадія отримання посівного матеріалу	Вода	300	Стадія отримання посівного матеріалу	Посівний матеріал	500
	Паста <i>Chlorella vulgaris</i> (паста живого штаму, згущена в 100 разів)	90			
Стадія отримання поживного середовища	Вода	750	Стадія отримання поживного середовища	Поживне середовище з Меляси	1700,35
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	2			
	кукурудзяний екстракт	2			
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,25			
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,3			
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,5			
	NaCl	0,3			
	меляса	15			
	CaCO <sub>3</sub>	3			

Стадія ферментативного гідролізу	Сировина	2000	Стадія культивування	Культуральна рідина	1900
	Біомаса з B.Subtilis	1000		Втрати	64
Стадія виділення жиру	жир	400	Стадія виділення жиру	Жир	360
				Інші речовини	40
ВСЬОГО	4564,35		ВСЬОГО	4564,35	

Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата

ЕКБ.БЕ6127.ДП

## РОЗДІЛ 4. ВИБІР І ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЛАДНАННЯ

### 4. 1. Розрахунок виробничої потужності.

Згідно з технологією отримання пептидів білкових гідролізатів з рибної сировини, а саме культивування *Bacillus subtilis*, пропонується проект виробництва пептидів в обсязі 2,5 т/добу, що на рік становить 835 т/рік, при безперервному режимі роботи підприємства.

Тривалість виготовлення партії, виходячи з найдовшої стадії виробництва, а саме культивування *Bacillus subtilis* у ферментері, становить 4 доби. При безперервному режимі роботи підприємства, враховуючи 30 днів на зупинки, ремонти, очищення обладнання і т.д. та партійність виробництва, проектна продуктивність праці підприємства:

$$Q_{\text{пр}} = 10 \text{ т/партію,}$$

$$\text{За 1 день} - 2,5 \text{ тонн}$$

де  $Q_{\text{пр}}$  – проектна продуктивність праці підприємства,  $V$  – загальна запланована потужність підприємства на рік,  $T$  – тривалість календарного року;  
 $t$  – час культивування

Для ферментерів номінальним об'ємом 50 м<sup>3</sup>, що використовуються на виробництві при обраному режимі роботи партійна продуктивність складає 0,75 м<sup>3</sup> (750 літрів) культуральної рідини на партію

За запропонованою технологією культивування вміст пептидів складає близько 45%.

Тому кількість біомаси, яку необхідно наростити складає:

$$m_{\text{бм}} = 2,5 / 0,45 = 5,5 \text{ т,}$$

(4.1.1)

де  $m_{\text{бм}}$  – суха біомаса грибів, кг;  $m_{\text{п}}$  – маса пептидів, яку необхідно одержати, кг;  $m_{\text{бм}} \rightarrow \text{ПЕП}$  – вміст пептидів у біомасі *Bacillus subtilis*.

					ЕКБ.БЕ6127.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 4. Вибір і характеристика обладнання	Стадія	Арк.	Акрушіє
Розроб.		Демків А.Р.						
							100	132
Керів.		Левтун І.І.				КПІ ім. Ігоря Сікорського,ФБТ		
Затверд.								

Концентрація біомаси становить - 4 кг/м<sup>3</sup>

Загальний об'єм виробництва складає:

$$V_{\text{заг}} = m_{\text{бм}} / C_{\text{бм}} = 5,5 / 0,04 = 137 \text{ м}^3, \quad (4.1.2)$$

Об'єм кришки і днища складає 30% об'єму реактора, їх об'ємом можна знехтувати оскільки 30% відповідає вимогам до коефіцієнта заповнення.

Кількість реакторів для виробництва 2,5 т/добу пептидів складатиме :

$$N = V_{\text{заг}} / V_{\text{ф}} = 137 / 50 = 2 \text{ шт} \quad (4.1.3)$$

Для перемішування культурального середовища в реакторі встановлено мішалки турбінні відкриті трьохярусні зі швидкість перемішування 1,92 с<sup>-1</sup> та барботуванням середовища повітрям.

## 4.2. Технічна характеристика ферментера

1. Апарат призначено для виробництва пептидів білкових гідролізатів з рибної сировини.

2. Номінальний об'єм: 50 м<sup>3</sup>

3. Робочий об'єм: 37,5 м<sup>3</sup>

4. Тип перемішуючого пристрою: мішалка турбінна відкрита трьохярусна

5. Кількість мішалок: 3

6. Кількість відбивних перегородок: 4

7. Частота обертання вала мішалки: 1,92 с<sup>-1</sup>

8. Потужність електродвигуна: 18кВт

9. Габаритні розміри (без опори та електродвигуна):  
ширина: 3572мм

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						101
ЗМН.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

висота: 8300мм

довжина: 3325мм

10. Маса: 19500 кг

#### 4.3. Вихідні дані для розрахунку

- Стерильне поживне середовище з вмістом цукрі 15% і сировина білкова (риба);.

- об'єм апарата  $V = 50 \text{ м}^3$ ;

- ферментер обладнаний турбінним перемішуючим пристроєм та рубашкою; - температура робочого середовища в ферментері  $38^\circ\text{C}$ ;

- охолодження робочого розчину в ферментері здійснюється шляхом подачі води в рубашку з температурою  $t_{\text{в}} = 21^\circ\text{C}$  . яка нагрівається .

Коефіцієнт заповнення апарата  $K_3 = 0,75$ .

#### 4.4. Конструктивний розрахунок

Для ферментеру з номінальним об'ємом  $V_H = 50 \text{ м}^3$  за ГОСТ 20680-2002 з кількох можливих діаметрів обираємо  $D = 3 \text{ м}$ .

Найчастіше в промисловості використовують турбінну шестилопатеву мішалку.

Розрахуємо робочий об'єм апарату:

$$V_p = V_H \cdot K_3 = 50 \cdot 0,75 = 37,5 \text{ м}^3, \quad (4.4.1)$$

де  $K_3$  – коефіцієнт заповнення.

Оскільки еліптичні днища є стандартними виробами, то за ГОСТ 6533-78 знаходимо решту конструктивних розмірів днища апарату:

$h_1 = 0,1 \text{ м}$  – висота основи еліптичного днища;

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						102
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



$s = 0,05$  м – товщина стінки еліптичного днища;

$V_{\text{дн}} = 4,229$  м<sup>3</sup> – об'єм еліптичного днища.

$F = 10,70$  м<sup>2</sup>, - площа еліптичного днища.

Для даного апарату обрано товщину стінки  $s = 50$  мм.

Повна висота днища апарату:

$$H_{\text{дн}} = h + h_1 = 0,75 + 0,1 = 0,85 \text{ м} \quad (4.4.2)$$

$$h = 0,25D = 0,75 \text{ м} \quad (4.4.3)$$

Повний об'єм ферментера  $V_n$  розраховуємо за формулою :

$$V_n = V_{\text{ц}} + 2 \cdot V_{\text{дн}} \quad (4.4.4)$$

, звідки знаходимо об'єм циліндричної частини апарату:

$$V_{\text{ц}} = V_n - 2 \cdot V_{\text{дн}} = 50 - 2 \cdot 4,229 = 41,542 \text{ м}^3, \quad (4.4.5)$$

Висота цилінтра:

$$H_{\text{ц}} = \frac{4V_{\text{ц}}}{\pi \cdot D^2} = \frac{4 \cdot 41,542}{3,14 \cdot 3^2} = 5,879 \text{ м} \quad (4.4.6)$$

$$H_{\text{цр}} = \frac{4 \cdot (V_p - V_{\text{дн}})}{\pi \cdot D^2} = \frac{4 \cdot (30 - 4,229)}{3,14 \cdot 3^2} = 3,64 \text{ м} \quad (4.4.7)$$

Далі визначаємо висоту рідини у ферментері за ГОСТ 20680 -75:

$$H_p = 5,59 \text{ м}.$$

#### 4.5. Розрахунок барботера

Витрата повітря:

$$V_{\Gamma} = \frac{\pi \cdot D^2}{4} \cdot w_z = \frac{3,14 \cdot 3^2}{4} \cdot 0,0035 = 0,247 \text{ м}^3/\text{с}, \quad (4.5.1)$$

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						103
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

$$w_{\Gamma}=(0,0035-0,0045) \text{ м/с},$$

Середній діаметр кільця барботера дорівнює діаметру мішалки:

$$d_{cp} = 0,8 \text{ м},$$

(4.5.2)

Діаметр труби барботера:

$$d_{б.в} = \sqrt{\frac{4 * V_{\Gamma}}{\pi * w_b}} = \sqrt{\frac{4 * 0,247}{3,14 * 20}} = 0,125 \text{ м},$$

(4.5.3)

$$w_b=(20-25) \text{ м/с},$$

Густина повітря при  $t_{cp}=38 \text{ }^{\circ}\text{C}$ :

$$\rho_z = \frac{\rho_0 * P * T_0}{P_0 * T} = \frac{1,29 * 0,208 * 273}{0,1 * 304} = 2,4 \text{ кг/м}^3,$$

(4.5.4)

Швидкість газу в отворі барботера:

$$w_0 = 3,4 * \sqrt{\frac{d_{б.в.} * p_p}{\rho_z}} = 3,4 * \sqrt{\frac{0,125 * 1063,15}{2,4}} = 25,3 \text{ м/с},$$

(4.5.5)

Частота обертання мішалки:

$$n = \frac{4 * V_{\Gamma}}{d_m^3} = \frac{4 * 0,247}{0,8^3} = 1,92 \text{ с}^{-1},$$

(4.5.6)

Довжина кола на якому повинні бути розташовані отвори:

$$l_{кола} = d_{cp} * 3,14 = 0,8 * 3,14 = 2,512 \text{ м}$$

(4.5.7)

Загальна кількість отворів у барботері :

$$z_0 = \frac{4 * V_{\Gamma}}{\pi * d_0^2 * w_0} = \frac{4 * 0,247}{3,14 * 0,005^2 * 25,3} = 500 \text{ шт},$$

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						104
ЗМН.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

(4.5.9)

Відстань між сусідніми отворами:

$$x = \frac{l_{\text{кола}}}{z_0} = \frac{2,512}{500} = 5 \text{ мм.}$$

(4.5.10)

Це менше ніж рекомендована відстань  $x_0=25-30$  мм. Для досягнення рекомендованої відстані можна розташувати отвори в декілька рядів.

Кількість отворів в одному ряді:

$$N_{\text{отв}} = \frac{l_{\text{кола}}}{x_0} = \frac{2512}{25} = 100 \text{ шт.},$$

(4.5.11)

Кількість рядів:

$$n_{\text{ряд}} = \frac{z_0}{N_{\text{отв}}} = \frac{500}{100} = 5 \text{ шт.},$$

(4.5.12)

#### 4.6. Розрахунок перемішуючого пристрою

На кожні 20 м<sup>3</sup> рідини рекомендовано встановлювати одну мішалку.

Тож використаємо 3. Основні параметри мішалок:

$$d_m = 0,25D = 0,25 \cdot 3 = 0,8 \text{ м.},$$

(4.6.1)

Приймаємо, що висота мішалки:

$$h_m = 0,2 \cdot d_m = 0,2 \cdot 0,8 = 0,16 \text{ м.},$$

(4.6.2)

Відстань мішалки до днища:

$$h = 0,6 \cdot d_m = 0,6 \cdot 0,8 = 0,48 \text{ м.},$$

(4.6.3)

Довжина лопасті мішалки:

$$L_l = 0,25d_m = 0,25 \cdot 0,8 = 0,2 \text{ м.},$$

(4.6.4)

Товщина відбивної перегородки:

$$b = d_m \cdot 0,1 = 0,8 \cdot 0,1 = 0,08 \text{ м.}$$

(4.6.5)

Для переміщення середовища з даною в'язкістю згідно  $n = 1,92 \text{ с}^{-1}$ , де  $n$  – число обертів мішалки.

Відцентровий критерій Рейнольдса:

$$Re_{цб} = \frac{\rho_p \cdot n^2 \cdot d_m^2}{\mu_p} = \frac{1063,15 \cdot 1,92^2 \cdot 0,8^2}{1,175 \cdot 10^{-3}} = 1,1 \cdot 10^6$$

(4.6.6)

де  $n$  – частота обертання. Рух рідини турбулентний ( $Re > 105$ ).

#### 4.7. Розрахунок глибини воронки

Параметр висоти завантаження  $y$  апарата визначають за формулою:

$$y = 8 \cdot \frac{H_p}{D} + 1 = 8 \cdot \frac{4,49}{3} + 1 = 12,97$$

(4.7.1)

Параметр гідравлічного опору мішалки  $E$  знаходять за формулою:

$$E = \frac{y}{7m \cdot zm \cdot Re_{цб}^{0,25}} = \frac{12,97}{8,4 \cdot 1 \cdot (184,21 \cdot 10^3)^{0,25}} = 0,07$$

(4.7.2)

$\Psi_1 = -0,6$ . – значення параметру розподілення

За значенням параметру  $\Psi_1$  знаходять параметр глибини воронки  $B$ .

$$B = 14.$$

Глибину воронки знаходять за формулою:

$$h_v = \frac{Bn^2d_m^2}{2} = \frac{14 \cdot 3^2 \cdot 0,8^2}{2} = 40,32 \text{ (м)};$$

(4.7.3)

Гранично допустима глибина воронки:

$$h_{zp} = H_p - h = 4,49$$

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						106
ЗМН.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

(4.7.4)

$$0,85 = 3,64 \text{ (м)} ;$$

Перевіряємо, чи виконується співвідношення:

$$h_6 > h_{zp} = 40,32 > 3,64.$$

(4.7.5)

Отже, в апараті встановлюються перегородки.

#### 4.8. Розрахунок потужності

Потужність  $N_m$ , що використовується перемішуючим пристроєм власне на перемішування, визначається за формулою:

$$N_m = k_n \cdot p_p \cdot n^3 \cdot d_m^5 = 7 \cdot 1063,15 \cdot 1,92^3 \cdot 0,8^5 = 17260,2 \text{ Вт} = 18 \text{ кВт}, (4.8.1)$$

де  $d_m$  – діаметр мішалки в [м];  $p_p$  – густина середовища в [кг/м<sup>3</sup>];  $n$  – частота обертання мішалки в [об/сек];  $K_N$  – критерій потужності.

Величина  $K_N$  залежить від центробіжного критерія  $Re_{цб}$ .

Для  $Re_{цб} = 1,1 \cdot 10^6$  з рисунку 5.5.1  $K_N = 7$ .

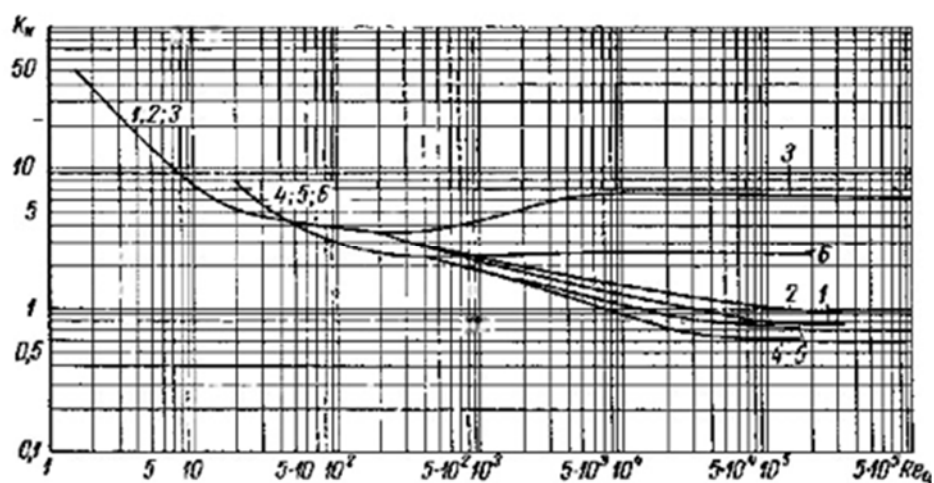


Рис.8.1 Графіки для визначення критерія потужності для турбінних відкритих (тип 1) та закритих (тип 2) перемішуючих пристроїв.

Потужність, що витрачається на перемішування газорідної суміші:

$$N_{zp} = N_p \cdot (1 - 1,26 \cdot K1) = 17260,2 \cdot (1 - 1,26 \cdot 0,25) = 11823,2 \text{ Вт}, (4.8.2)$$

де  $K1$  – критерій витрати газу:

$$K1 = \frac{V_2}{n \cdot d_m^3} = \frac{0,247}{1,92 \cdot 0,8^3} = 0,25 \quad (4.8.3)$$

Розрахункова потужність на валу мішалки:

$$N_p = k_1 \cdot k_2 \cdot \left( \sum k + 1 \right) \cdot N_m; \quad (4.8.4)$$

де  $k_2$  – коефіцієнт, що враховує збільшення потужності, що споживається, при пуску чи в результаті збільшення опору середовища при перемішуванні, приймаємо  $k_2 = 1,1$ .

Коефіцієнт, що враховує ступінь заповнення апарату середовищем:

$$k_1 = \frac{H_p}{D_{вн}};$$

$$k_1 = \frac{5,57}{3,0} = 1,85. \quad (4.8.5)$$

Сума коефіцієнтів, що враховують збільшення потужності через наявність в апараті допоміжних пристроїв :

$$\sum k = 1,1 + 1,85 = 2,95 \quad (4.8.6)$$

Тоді :

$$N_p = 1,85 \cdot 1,1 \cdot (2,95 + 1) \cdot 17260,2 = 138741,8 \text{ (Вт)} . \quad (4.8.7)$$

Мінімальна потужність електродвигуна приводу:

$$N_{np} = \frac{N_p}{\eta} = \frac{138741,8}{0,9} = 154157,5 \text{ Вт}, \quad (4.8.8)$$

де  $\eta$  – К.К.Д. приводу мішалки = 0,9 .

Приймаємо потужність електродвигуна 155 кВт. Потужність електродвигуна достатня для того, щоб забезпечити перемішування культуральної рідини турбінною мішалкою діаметром з частотою обертання вала  $1,92 \text{ с}^{-1}$  .

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						108
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

#### 4.9. Розрахунок штуцерів

Мета: Виконати розрахунок геометричних параметрів штуцерів.

Порядок розрахунку передбачає розрахунок діаметру штуцера.

Вихідні дані:

масові витрати води, кг/с, $G_1$	0,303;
густина води, кг/м <sup>3</sup> , $\rho_1$	999,7;
масові витрати повітря, кг/с, $G_2$	0,0232;
густина повітря, кг/м <sup>3</sup> , $\rho_2$	1,165;
масові витрати сировини, кг/с, $G_3$	2000;
густина води, кг/м <sup>3</sup> , $\rho_3$	996;

Порядок розрахунку:

Діаметр штуцерів визначається за формулою:

$$d = \sqrt{\frac{4G}{\pi \omega \dot{r}}}, \quad (4.9.1)$$

де  $G$  – масовий видаток теплоносія,  $\omega$  – густина теплоносія,  $\dot{r}$  – швидкість руху теплоносія в штуцері.

Приймаємо швидкість руху води в штуцері  $\dot{r} = 1,5$  м/с, швидкість руху середовища та продукту в штуцері  $\dot{r} = 20$  м/с, швидкість руху повітря в штуцері  $\dot{r} = 14$  м/с.

Діаметр патрубку для подачі та відведення води:

$$d_l = \sqrt{\frac{4G_1}{\pi \omega_l \dot{r}_l}} = \sqrt{\frac{4 \cdot 0,302}{3,14 \cdot 999,7 \cdot 1,5}} = 0,01602 \text{ м} \quad (4.9.2)$$

Вибираємо штуцер для подачі та відведення води:

Діаметр штуцера:  $d_T = 0,025$  м

Товщина стінки штуцера:  $s_T = 0,003$  м

Виліт:  $H_T = 0$  м.

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						109
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Діаметр патрубку для подачі та відведення повітря:

$$d2 = \sqrt{\frac{4G2}{\pi \dot{\omega}_2 \dot{p}_2}} = \sqrt{\frac{4*0,0232}{3,14*1,165*14}} = 0,4255_m$$

(4.9.3)

Вибираємо штуцер для подачі та відведення повітря:

Діаметр штуцера:  $d_T = 0,045$  м

Товщина стінки штуцера:  $s_T = 0,003$  м

Виліт:  $H_T = 0,155$  м.

Діаметр патрубку входу середовища та виходу продукту:

$$d3 = \sqrt{\frac{4G3}{\pi \dot{\omega}_3 \dot{p}_3}} = \sqrt{\frac{4*2000}{3,14*996*20}} = 0,357_m$$

(4.9.4)

Вибираємо штуцер входу середовища та виходу продукту:

Діаметр штуцера:  $d_T = 0,360$  м

Товщина стінки штуцера:  $s_T = 0,01$  м

Виліт:  $H_T = 0,21$  м.

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						110
ЗМН.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		



## РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ОХОРОНА ДОВКІЛЛЯ

Підвищення технічної оснащеності сучасних підприємств, застосування нових матеріалів, конструкцій і процесів, підвищення швидкостей і потужностей машин впливають на характер і частоту нещасних випадків і захворювань на виробництві [76].

Автоматизація виробництва зменшила затрати праці на одиницю продукції, однак з'явився ряд проблем, пов'язаних з підвищенням нервово-психічного навантаження на операторів, і т.п [76]. Закон «Про охорону праці» зобов'язує роботодавця створити задовільні умови на кожному робочому місці відповідно до нормативно-правових актів, а також забезпечити додержання вимог законодавства щодо прав працівників у галузі охорони праці [76].

Охорона праці й поліпшення умов праці є одним з найважливіших завдань на сьогоднішній день. Безпечне ведення технологічного процесу знижує можливість травматизму, підвищує працездатність обслуговуючого персоналу [76]. Установки повинні мати конструкцію, компоновку устаткування і трубопроводів, які забезпечують умови роботи обслуговуючого персоналу відповідно до діючих норм техніки безпеки і ергономіки [76]. На персонал впливають такі фактори як: можливість ураження електричним струмом, шум, вміст газових домішок у повітрі, які можуть привести до вибуху та отруєння, біологічне ураження продуктом. Основні фактори [76]:

- 1) виробничий шум і вібрації;
- 2) повітря робочої зони;
- 3) електробезпека;
- 4) пожежна та вибухонебезпека;

					ЕКБ.БЕ6127.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Розділ 5. Охорона праці та довкілля	Стадія	Арк.	Акрушіє
Розроб.		Демків А.Р.					111	132
Керів.		Левтун І.І.						
Затверд.						КПІ ім. Ігоря Сікорського,ФБТ		

Найбільш часті причини аварій посудин, що працюють під тиском, це невідповідність конструкції максимально допустимому тиску і температурі; втрата механічної міцності апарата (корозія, внутрішні дефекти металу, місцеві перегріву) [76]; невиконання встановленого режиму роботи; недостатня кваліфікація обслуговуючого персоналу; відсутність належного технічного нагляду [76]. Вимоги безпеки, що пред'являються до конструкції, виготовлення, та експлуатації посудин, що працюють під тиском, визначені «Правилами будови і безпечної експлуатації посудин, що працюють під тиском» [76].

*Рівень шуму та вібрацій.* Приміщення, в якому розміщена лінія - закритого типу [77]. Основними джерелами шуму при роботі є електродвигуни, компресори та інше устаткування в яких шум досягає 90 дБА. Згідно норм ДСН 3.3.6.037-99 шум, при роботі, не повинен перевищувати 80 дБА [77]. Заходи та матеріали, що застосовуються задля зниження шуму механічного походження включають: - використання облицювального шумоізоляційного матеріалу з перфоруванням; - звукоізоляція устаткування за допомогою глушників, резонаторів, кожухів, захисних конструкцій, тощо; - звукоізоляція дверного проїому приміщення, покриття стін та підлоги; - своєчасне змащування всіх поверхонь, що труться; - застосування раціональних конструкцій, нових матеріалів і технологічних процесів [77]. Ці заходи дозволяють знизити рівень шуму до прийнятного згідно ДСН 3.3.6.037-99 [77].

*Повітря робочої зони.* Вентиляційна система має забезпечити виведення пилу з приміщення і доведення якості повітря до встановлених норм [77]. Для індивідуального захисту працівників від летючих подразників застосовують респіратори, протигази, захисні костюми. Аеродинамічні випробування вентиляційних систем проводять не рідше одного разу на рік, а також після кожного капітального ремонту або реконструкції [77].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						112
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Якщо вентиляційна система не забезпечує нормальних умов і чистоти повітря у приміщеннях, то застосовують систему кондиціювання повітря. Необхідно забезпечити захист працівників від елементів устаткування, нагрітих до високих температур і теплового випромінювання яке не повинно перевищувати  $\frac{W}{m^2} = 350 \text{ Вт/м}^2$  [78]. Апарати повинні мати теплоізоляцію з мінеральної вати товщиною від 10 см, що забезпечить прийнятну температуру на поверхні барабана і теплове випромінювання відповідно до ДСН 3.3.6.042-99 [78]. Перед запуском технологічних апаратів необхідно провести промивку і продувку всіх комунікацій і устаткування, перевірити їх герметичність [77]. Всі насоси, завантажувальні пристрої та інші механізми і машини перевіряють без навантаження і під навантаженням на інертних середовищах [78]. Приміщення обладнанні стендами з зазначеними правилами техніки безпеки, правилами з експлуатації установки, стендами з планом евакуаційних виходів [77]. Перед початком робіт працівники повинні проходити інструктаж з техніки безпеки [77].

*Електробезпека.* Приміщення операторної згідно ПУЕ-2017 відноситься до приміщень із підвищеною небезпекою, тому що можливий одночасний дотик людини до з'єднаних під землею технологічних апаратів і металевих корпусів електроустаткування [79].

Основні причини нещасного випадку від впливу електричного струму наступні [79]:

- випадковий дотик або наближення на небезпечну відстань до струмопровідних частин, що перебувають під напругою;
- поява напруги на конструктивних металевих частинах електроустаткування - корпусах, кожухах - у результаті ушкодження ізоляції й інших причин;

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						113
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- виникнення крокової напруги на поверхні землі в результаті замикання дроту на землю.

Щоб уникнути нещасних випадків застосовується захисне занулення із глухозаземленою нейтраллю [78]. Щоб уникнути ураження від статичної електрики, тому що приміщення категорійне, робиться сітка з металевих пластин перетином  $25 \times 4$  мм, що розташовується по периметру приміщення, і до якої приєднують мідним дротом  $S = 10 \text{ мм}^2$  металеві частини апаратів й устаткування, які перебувають у цьому приміщенні [79]. Для забезпечення безпечної роботи з електроустаткуванням – кабелі та дроти вкладені в труби й заховані під підлогу, рубильники ввімкнення закриті в спеціальні шафи, при роботі з електроінструментами застосовуються індивідуальні засоби захисту [79].

У зв'язку з вищевикладеним пропонується дотримуватися наступних правил техніки безпеки й проводити наступний комплекс заходів щодо забезпечення електробезпеки на проєктованій ділянці [79]:

1. Для запобігання небезпеки ураження електричним струмом, устаткування повинне мати надійний металевий зв'язок корпусів електродвигунів, щитів, постів електроапаратури і сталевих труб електропроводки із заземлювальним контуром.
2. При експлуатації електроустаткування необхідно дотримуватися наступних правил безпечної роботи:

- забороняється доторкатися до електропроводів, робити ремонт електроустаткування, знімати й установлювати електролампи, запобіжники й інші деталі електроустаткування особам, які не мають права допуску [79];

- входити в розподільну щитову, відкривати електрозбірки, входити в місця, де висять таблички «Вхід заборонений», «Небезпечно для життя» й інші попереджувальні написи. Вхід дозволяється чітко обмеженому колу людей з дотриманням правил про допуск;

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						114
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

- для переносного освітлення користуватися лампами напругою не більше 12 В;

- перед проведенням ремонтних робіт на встаткуванні лінії електродвигуни повинні бути зупинені, знеструмлені й від'єднані від приводів, на пускових кнопках повинні бути вивішені плакати «Не вмикати, працюють люди». Відключення електроенергії проводиться електриком;

- відповідальний електрик за електрогосподарство лінії систематично перевіряє відповідність заземлення устаткування правилам технічної експлуатації, особливо після його ремонту;

- установлення плакатів і знаків безпеки.

*Пожежна безпека.* Цех в якому знаходиться установка виробництва будується з використанням негорючих матеріалів (бетона, залізобетона), тому стійкість споруди за ДБН В.1.1-7-2002 відповідає ступеню вогнестійкості II [81].

В разі виникнення пожежі встановлені датчики-сповіщувачі, які спрацьовують при підвищенні температури до 89°C. Для гасіння невеликих ділянок загорання при виключеному та включеному (до 1000В) електроустаткуванні застосовують вуглекислотні вогнегасники ОУ-5 (2 шт.) та порошкові ОП-10 (2 шт.).

Як стаціонарні засоби пожежогасіння встановлені самоспрацьовуючі вогнегасники САМ-9 (25 шт) [80]. У приміщенні, де розташовується установка, на відстані 30 метрів одне від одного встановлені пожежні гідранти з рукавами довжиною до 10 метрів. Відстань до пожежного виходу не більше 40 метрів [81]. Відповідно до ДБН В.1.1-7-2002 кількість виходів - не менше двох. Ширина дверей евакуаційного виходу - 2 метри. Двері евакуаційного виходу відкриваються на зовні [81].

*Охорона навколишнього середовища.*

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						115
ЗМН.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

Останніми роками спостерігається постійне зростання експлуатації енергетичних ресурсів, і орієнтовна кількість, що використовується для споживання людиною (105,6 млн. Т), становить 75% світового світового виробництва [81]. Решта (25% улову, що дорівнює приблизно 34,8 млн. тонн) вважаються відходами (FAO 2007). Крім того, комерційна, переробна промисловість виробляє великі кількості відходів та стічних вод. Тверді відходи після переробки риби, що становлять 20–60% від вихідної сировини, містять різні види залишків (цілі відходи, ш, голова, внутрішні органи, шкіра, кістки, кров, рак печінки, статеві залози, кишки, частина м'язової тканини тощо) [80]. У деяких країнах ці викиди не використовуються, а спалюються або скидаються в море, що спричиняє екологічні проблеми [80]. Останнім часом екологічні норми стають суворішими, вимагаючи нових методів утилізації, заснованих на тому, що відходи від риби та гідробіонтів в цілому можуть розглядатися як важливе джерело поліпептидів, амінокислот, ліпідів та мінералів з високою біологічною цінністю [80].

Нормальні умови працюючих на підприємствах забезпечуються за допомогою притоко-витяжної вентиляції, що здійснює 4-8 кратний повітрообмін в приміщенні, що вентилюється [80]. Повітря, що подається в виробничі приміщення повинне мати температуру 18-20°C та відносну вологість 60-65% [80]. При використанні вологого прибирання підлог рекомендується робити підлогу під нахилом, та забезпечувати трапами, що дозволяють швидко прибирати вологу. Для поліпшення санітарних умов стіни обладнують з спеціальної керамічної плитки [80].

Основними методами профілактики на виробництві є: максимальна герметизація обладнання та механізація процесів; прийом під час роботи молочного колібактерину чи молока, застосування індивідуальних засобів захисту (комбінезони, шоломи-капюшони, халати, рукавички, косинки, респіратори), щоденний теплий душ після роботи, знепилювання, миття то ополіскування рук перед прийомами їжі, щорічний медичний огляд [81]. До роботи на підприємствах не треба допускати осіб з захворюваннями печінки,

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						116
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

нирок, легенів, кишкового тракту, а також схильних до шкіряних захворювань [81].

Несприятливі фактори знижують працездатність та ефективність праці персоналу, підвищується втомлюваність [78]. Створення оптимальних параметрів досягається шляхом автоматизації процесу, кондиціювання та вентиляції всіх відділень приміщення, освітленість, рівень шуму та вібрації. Всі апарати, які випромінюють тепло мають бути накритими відповідними теплоізоляційними матеріалами [78].

При монтажі обладнання для ферментерів мають бути передбачені деталі та механізми, що забезпечувати безпечну роботу персоналу та виключають можливість пошкодження виробу, а сама експлуатація установки має відповідати діючим на виробництві інструкціям, вказівним документам, розробленими до даного проекту [78, 81].

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						117
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## ВИСНОВКИ

Було здійснено літературний огляд відходів рибної промисловості як сировину і процесу культивування мікроорганізмів для подальшого отримання пептидів білкових гідролізатів, визначено актуальність даного напрямку виробництва та описано технологічні рішення, необхідні для реалізації проектування.

На сьогоднішній день проблема пошуку нових методів та сировини для отримання пептидів є надзвичайно актуальною і викликає інтерес науковців у всьому світі. З огляду на це, існує безліч досліджень використання відходів рибної промисловості для переробки їх з метою отримання цінних біологічно активних речовин. Вирішення цього питання зможе подолати відразу дві проблеми: утилізація великої кількості відходів від рибопереробки та дефіцит сировини для отримання пептидів, ліпідів, амінокислот тощо.

Було виконано наступні завдання: розроблено проект біотехнологічного отримання пептидів шляхом ферментативного гідролізу сировини з відходів рибної промисловості за використання мікроорганізмів з метою виділення якісного продукту пептидів білкового гідролізату - кормової добавки.

В проекті обґрунтовано вибір процесу безперервної ферментації біосировини з отриманням необхідного гідролізату, який відповідає новітнім досягненням науки і техніки.

Вибрано найбільш вигідну вихідну сировину та біологічний агент, наведені вимоги до біосировини, запропоновано схема підготовки виробництва до ферментації, вказані оптимальні режими етапів виробничого процесу, розраховано матеріальний баланс процесу, наведена і описана

					ЕКБ.БЕ6127.ДП			
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	Висновки	Стадія	Арк.	Акрушів
Розроб.		Демків А.Р.						
Керів.		Левтун І.І.					118	132
Затверд.						КПІ ім. Ігоря Сікорського,ФБТ		



технологічна схема виробництва пептидів білкових гідролізатів, обґрунтовано вибір основного обладнання (виробничого ферментера) і розраховано його основні технологічні параметри. Також обрано допоміжне обладнання, параметри контролю етапів процесу, необхідні для забезпечення якості кінцевої продукції, наведено основи охорони праці і довкілля.

1. Було проведено літературний огляд та розроблено проект біотехнологічного отримання пептидів шляхом ферментативного гідролізу сировини з відходів рибної промисловості за використання мікроорганізмів *B.Subtilis*, які характеризуються високим ступенем здатності накопичення пептидів, з метою виділення якісного продукту пептидів білкового гідролізату - кормової добавки для харчової промисловості.
2. В проекті обґрунтовано вибір процесу ферментативного гідролізу біосировини з отриманням необхідного гідролізату, який відповідає новітнім досягненням науки і техніки та ДСТУ 8029:2015 оскільки продукт містить дуже невеликі кількості жиру і біологічних мікронутрієнтів, менше 0,1% . Даний процес дає можливість проведення процесу без використання гідроксиду натрію, присутність якого створює проблеми при виробництві пептидів в промисловому масштабі. У даному методі використовуються природні ферменти, вже присутні в сировині що забезпечує проведення гідролізу більш стійким і менш дорогим способом. Крім цього, умови повинні безпосередньо адаптуватися до активності ендогенних ферментів. Активні ферменти , що в процесі утримуються на фільтрі, впливають на нефільтровані білки і пептиди . Все це забезпечує значні переваги в тому, що стосується вартості, терміну служби та ефективності фільтрів, якості продуктів і ступеня утилізації системи і процесу .

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						119
ЗМН.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

3. Вибрано вихідну сировину як найбільш вигідну, оскільки обрана містить найвищий рівень вмісту білків, пептидів, та ендогенних ферментів. Наведені вимоги до біосировини, що відповідає стандартам, запропоновано схему підготовки виробництва до ферментації, вказані оптимальні режими етапів виробничого процесу, розраховано матеріальний баланс процесу, наведена і описана технологічна схема виробництва пептидів білкових гідролізатів, обґрунтовано вибір основного обладнання (виробничого ферментера) і розраховано його основні технологічні параметри. Також обрано допоміжне обладнання, що забезпечує найбільшу якість і ефективність процесу, параметри контролю етапів процесу, необхідні для забезпечення якості кінцевої продукції, наведено основи охорони праці і довкілля.
4. Було проведено літературний огляд та обрано раціональні параметри ферментативного гідролізу для отримання пептидів. Процес здійснюється при рН 7,60-8,20, оскільки даний режим обирається з умов життєдіяльності біологічного агенту і активності ендогенних ферментів. Процес утворення пептидів в ферментері протікає при перемішуванні і аерації середовища при температурі 38-46 °С протягом 72 год. Наприкінці процесу концентрація гідролізату досягає 85 г./л.
5. Було розраховано технічні показники ферментера з еліптичною кришкою та еліптичним днищем з перемішуючим пристроєм турбінного типу та барботером, завдяки своїй простоті конструкції, а також можливістю інтенсифікації масообміну. Результатом є використання на виробництві реактору загальним об'ємом ( $V_{\text{заг}}$ )  $50\text{ м}^3$  і робочим об'ємом ( $V$ )  $37,5\text{ м}^3$  для отримання 835 тонн продукту на рік.
6. Розроблено технологічну і апаратурну схеми ферментативного гідролізу сировини з відходів рибної промисловості за використання мікроорганізмів, та розроблено креслення ферментера з еліптичною кришкою та еліптичним днищем з перемішуючим пристроєм турбінного

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						120
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

типу та барботером для проведення процесу культивування згідно обраних параметрів стадії ферментативного гідролізу.

7. Запропоновано заходи для забезпечення охорони праці, техніки безпеки, охорони довкілля згідно до ДСТУ.

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						121
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Петрова И. Б., Клименко А. И. Комплексная переработка отходов рыбоперерабатывающих производств: обзор // Молодой ученый. — 2012. — №9.—С.61-63.
2. Wald M , Schwarz K , Rehbein H , Bußmann B , Beermann C. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin // Food Chem. 2016;205:221-8
3. Fariha H. Industrial applications of microbial lipases // Enzyme and Microbial Technology.2006.No.2,Vol.39.pp.235-251.
4. Chalamaiah M., Kumar D., Hemalatha R., Jyothirmayi T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications // Review. Food Chem. — 2012. — Vol. 135. — P. 3020–3038.
5. Harada K., Maeda T., Hasegawa Y. et al. Antioxidant activity of fish sauces including puffer (*Lagocephalus wheeleri*) fish sauce measured by the oxygen radical absorbance capacity method // Molecular Medicine Reports. — 2010. — Vol. 3, № 4. P.663–668.
6. Girgih A.T., Udenigwe C.C., Hasan F.M. et al. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC // Food Research International. — 2013. — Vol. 52, № 1. — P. 315–322.

					<i>ЕКБ.БЕ6127.ДП</i>		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата			
Розроб.		Демків А.Р.			<b>Список використаної літератури</b>	Стадія	Арк.
							Акрушів
							122 132
Керів.		Левтун І.І.				<i>КПІ ім. Ігоря Сікорського,ФБТ</i>	
Затверд.							

7. Ko J.Y., Lee J.H., Samarakoon K. et al. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases // Food and Chemical Toxicology. — 2013. — Vol. 52. — P. 113–120.
  
8. Ahn Chang-Bum, Kim Jeong-Gyun, Je Jae-Young. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion // Food Chemistry. — 2014. — Vol. 147. — P. 78–83.
  
9. Najafian L, Babji AS. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. Peptides. 2012;33(1):178-185.
  
10. Kumar NSS, Nazeer RA, Jaiganesh R. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Scomber japonicus*) and croaker (*Otolithes ruber*). Amino Acids. 2012;42(5):1641-1649.
  
11. Najafian L, Babji AS. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. Peptides. 2012;33(1):178-185.
  
12. Ngo DH, Vo TS, Ngo DN, et al. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. International Journal of Biological Macromolecules. 2012;51(4):378-383.
  
13. Kang HK, Seo CH, Park Y. Marine peptides and their anti-infective activities. Marine drugs. 2015;13(1):618-654.

14. Cheung RCF, Ng TB, Wong JH, et al. Marine natural products with anti-inflammatory activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015:1-22
15. Уракова И.Н., Пожарицкая О.Н., Демченко Д.В., и др. Биологическая активность и способы получения пептидов из рыб // *Биология моря*. – 2012. 427.
16. Karnjanapratum S, O’Callaghan YC, Benjakul S, et al. Antioxidant, immunomodulatory and antiproliferative effects of gelatin hydrolysate from unicorn leatherjacket skin. *J of the Science of Food and Agriculture*. 2016.
17. Mamelona J, Pelletier E. Producing high antioxidant activity extracts from echinoderm by products by using pressured liquid extraction. *Biotechnology*. 2010;9:523-528.
18. Kacem M, Sellami M, Kammoun W, Frikha F, Miled N, Ben Rebah F (2011) Seasonal variations of chemical composition and fatty acid profiles of viscera of three marine species from the Tunisian coast. *J Aquat Food Prod Technol* 20:233–246
19. Максимюк Н.Н., Марьяновская Ю.В. О преимуществах ферментативного способа получения белков // *Современные проблемы науки и образования*. – 2009. – №1.;
20. Venugopal V. Enzymes from Seafood Processing Waste and Their Applications in Seafood Processing // *Adv Food Nutr Res*. 2016;78:47-69
21. Гринштейн Дж., Виниц М., Химия аминокислот и пептидов, пер. с англ., М., 1965;
22. Patent. 2333663 Aminotek Ас:Способ получения пептидов из сырья, содержащего белок, продукты, получаемые таким способом, и применение этих продуктов.

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						124
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

23. Шредер Э., Любке К., Пептиды, пер. с англ., т. 1 2, М., 1967; Новые методы анализа аминокислот, пептидов и белков, пер. с англ., М., 1974;
24. Ленинджер А., Основы биохимии, пер. с англ., т. 1 3, М., 1985;
25. Huang CY, Wu CH, Yang JI, Li YH, Kuo JM. Evaluation of iron-binding activity of collagen peptides prepared from the scales of four cultivated fishes in Taiwan. J Food Drug Anal. 2015;23:671–8.
26. Daniel Annaney-Obiri, Lovie G., Matthews, RezaTahergorabi. Proteins From Fish Processing By-Products // Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications 2019, Pages 163-191.
27. Kumar A., Bhaskar N., Baskaran V. Bioefficacy of EPA-DHA from lipids recovered from fish processing wastes through biotechnological approaches // Food Chemistry. 2013. V. 136, Iss. 1. P. 80–86.
28. Wang TY, Hsieh CH, Hung CC, Jao CL, Chen MC, Hsu KC. Fish skin gelatin hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV inhibitors and glucagon-like peptide-1 stimulators improve glycaemic control in diabetic rats: a comparison between warm- and cold-water fish. J Funct. 2015;19:330–40.
29. Mbatia B., Adlercreutz D., Adlercreutz P. et al. Enzymatic oil extraction and positional analysis of  $\omega$ -3 fatty acids in Nile perch and salmon heads // Process Biochemistry. 2010. V. 45, Iss. 5. P. 815–819.
30. Ramakrishnan V. V., Ghaly A. E., Brooks M. S. et al. Extraction of oil from mackerel fish processing waste using Alcalase enzyme // Enzyme Engineering. 2013. V. 2, Iss. 2. P. 1–10
31. Routray W., Deepika D., Vegneshwaran V. et al. Production of high quality fish oil by enzymatic protein hydrolysis from cultured Atlantic salmon by-products: Investigation on effect of various extraction parameters using central composite rotatable design // Waste and Biomass Valorization.
32. Kim SK, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. J Funct Foods. 2010;2:1–9.

33. Bernardini RD, Harnedy P, Bolton D, Kerry J, O'Neill E, Mullen AM, et al. Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. Food Chem. 2011;4:1296–307.
34. Halim NRA, Yusof HM, Sarbon NM. Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: a comprehensive review. Trends Food Sci Technol. 2016;51:24–33.
35. Mahboob S. Isolation and characterization of collagen from fish waste material-skin, scales and fins of *Catla catla* and *Cirrhinus mrigala*. J Food Sci Technol. 2014;52:4296–305.
36. Carrillo W, Ramos M. Identification of Antimicrobial Peptides of Native and Heated Hydrolysates from Hen Egg White Lysozyme // J Med Food. 2018 Sep;21(9):915-926.
37. Jeong, H.-S.; Venkatesan, J.; Kim, S.-K. Isolation and characterization of collagen from marine fish (*Thunnus obesus*). Biotechnol. Bioprocess Eng. 2013, 18, 1185–1191.
38. Kim, S.-K. Marine Proteins and Peptides: Biological Activities and Applications; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2013.
39. Khora, S.S. Marine fish-derived bioactive peptides and proteins for human therapeutics. Int. J. Pharm. Pharm. Sci. 2013, 5, 31–37.
40. Kim, S.K. Marine cosmeceuticals. J. Cosmet. Dermatol. 2014, 13, 56–67.
41. Je, J.-Y.; Qian, Z.-J.; Lee, S.-H.; Byun, H.-G.; Kim, S.-K. Purification and antioxidant properties of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) dark muscle peptide on free radical-mediated oxidative systems. J. Med. Food 2008, 11, 629–637.
42. Kim SK, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: a review. J Funct Foods. 2010;2:1–9.
43. Karaulova E.P., Chepkasova A.I., Slutskaya T.N., Shulgina L.V., Yakush E.V. Antiradical effect of low-molecular peptides in extracts and hydrolyzates from tissues of water organisms // Izv. TINRO. — 2015. — Vol. 182. — P. 269–276.



44. Аламдари, Х. Определение оптимальных режимов получения белковых гидролизovaných компонентов из кильки для стартовых кормов осетровых рыб / Х. Аламдари, Н. В. Долганова, С. В. Пономарев // Вестник АГТУ. Сер.: Рыбное хозяйство. – 2013. – № 1. – С. 173-179.
45. Barbosa TM, et al. Screening for bacillus isolates in the broiler gastrointestinal tract. Applied and environmental microbiology. 2005;71:968–978.
46. [Tam NK, et al. The intestinal life cycle of Bacillus subtilis and close relatives. J Bacteriol. 2006;188:2692–2700.
47. Leser TD, et al. Germination and outgrowth of Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis spores in the gastrointestinal tract of pigs. J Appl Microbiol 2007
48. Hong HA, et al. The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS microbiology reviews. 2005;29:813–835.
49. Inatsu Y, et al. Characterization of Bacillus subtilis strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. Letters in applied microbiology. 2006;43:237–242.
50. Casula G, Cutting SM. Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. Applied and environmental microbiology. 2002;68:2344–2352.
51. Hoa TT, et al. Fate and dissemination of Bacillus subtilis spores in a murine model. Applied and environmental microbiology. 2001;67:3819–3823.
52. La Ragione RM, et al. Bacillus subtilis spores competitively exclude Escherichia coli O78:K80 in poultry. Veterinary microbiology. 2001;79:133–142.
53. Hall N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. The Journal of experimental biology. 2007;210:1518–1525.
54. Kunst F, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis. Nature. 1997;390:249–256.
55. Folmsbee MJ, et al. Anaerobic growth of Bacillus mojavensis and Bacillus subtilis requires deoxyribonucleosides or DNA. Applied and environmental microbiology. 2004;70:5252–5257.

56. І.Ю. Царенко, А.О. Рой, І.К. Курдиш ОПТИМІЗАЦІЯ ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ *BACILLUS SUBTILIS*. ISSN 0201-8462. Мікробіол. журн., 2011, Т. 73, № 2
57. Общая технология микробиологических производств. / М.С.Мосичев, А.А.Складнев, В.Б Котов. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1982 – 264 с.
58. Максимюк Н.Н., Марьяновская Ю.В. О преимуществах ферментативного способа получения белков // Современные проблемы науки и образования. – 2009. – №1.;
59. Kumar A., Bhaskar N., Baskaran V. Bioefficacy of EPA-DHA from lipids recovered from fish processing wastes through biotechnological approaches // Food Chemistry. 2013. V. 136, Iss. 1. P. 80–86.
60. Mbatia B., Adlercreutz D., Adlercreutz P. et al. Enzymatic oil extraction and positional analysis of  $\omega$ -3 fatty acids in Nile perch and salmon heads // Process Biochemistry. 2010. V. 45, Iss. 5. P. 815–819.
61. Ramakrishnan V. V., Ghaly A. E., Brooks M. S. et al. Extraction of oil from mackerel fish processing waste using Alcalase enzyme // Enzyme Engineering. 2013. V. 2, Iss. 2. P. 1–10
62. Daniel Annaney-Obiri, Lovie G., Matthews, RezaTahergorabi. Proteins From Fish Processing By-Products // Proteins: Sustainable Source, Processing and Applications 2019, Pages 163-191.
63. Huang CY, Wu CH, Yang JI, Li YH, Kuo JM. Evaluation of iron-binding activity of collagen peptides prepared from the scales of four cultivated fishes in Taiwan. J Food Drug Anal. 2015;23:671–8.
64. Halim NRA, Yusof HM, Sarbon NM. Functional and bioactive properties of fish protein hydolysates and peptides: a comprehensive review. Trends Food Sci Technol. 2016;51:24–33.
65. Mbatia B., Adlercreutz D., Adlercreutz P. et al. Enzymatic oil extraction and positional analysis of  $\omega$ -3 fatty acids in Nile perch and salmon heads // Process Biochemistry. 2010. V. 45, Iss. 5. P. 815–819.

66. Wald M , Schwarz K , Rehbein H , Bußmann B , Beermann C. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin // Food Chem. 2016;205:221-8
67. Halim NRA, Yusof HM, Sarbon NM. Functional and bioactive properties of fish protein hydolysates and peptides: a comprehensive review. Trends Food Sci Technol. 2016;51:24–33.
68. Routray W., Deepika D., Vegneshwaran V. et al. Production of high quality fish oil by enzymatic protein hydrolysis from cultured Atlantic salmon by-products: Investigation on effect of various extraction parameters using central composite rotatable design // Waste and Biomass Valorization.
69. Реакции на полимерных подложках в органическом синтезе, пер. с англ., М., 1983, с. 417 97;
70. Якуб-ке Х.-Д., Ешкайт Х., Аминокислоты, пептиды, белки, пер. с нем., М., 1985.
71. Дэвени Т., Гергей Я., Аминокислоты, пептиды и белки, пер. с англ., М., 1976;
72. Технічні умови 10.8 - 38793927 - 001:2015
73. Антипова, Л.В. Оценка возможности использования природных биополимеров рыбного происхождения в технологиях лакокрасочных покрытий / Л.В. Антипова, О.П. Дворянинова, А.В. Соколов, Т.С. Гаршина, С.С.
74. Капрельянц Л.В., Пилипенко Л. М., Єгорова А. В. та ін. М 59 Мікробіологія харчових виробництв: навчальний посібник. / – Херсон: ОЛДІ-ПЛЮС, 2017. – 478 с.
75. Наказ МОЗ України № 548 від 19.07.2012 Про затвердження Мікробіологічних критеріїв для встановлення показників безпечності харчових продуктів.
76. Закон «Про охорону праці». 1.1-36:2016
77. ДСН 3.3.6.037-99 «Санітарні норми виробничого шуму, ультразвуку та інфразвуку».
78. ДСН 3.3.6.042-99 «Санітарні норми мікроклімату виробничих приміщень».

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						129
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

79. Правила улаштування електроустановок, 2017р.
80. ДСТУ Б В.1.1-36:2016 «Визначення категорій приміщень, будинків та зовнішніх установок за вибухопожежною та пожежною небезпекою».
81. ДБН В.1.1-7-2002 «Пожежна безпека об'єктів будівництва. Загальні вимоги».

					ЕКБ.БЕ6127.ДП	Арк.
						130
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата		

## ДОДАТКИ

### ВІДОМІСТЬ СПЕЦИФІКАЦІЇ ОБЛАДНАННЯ

Позиція	Позначення	Найменування	Кількість	Маса	Примітка
1	2	3	4	5	6
ПР-1		Пробірка з рідким поживним середовищем для культивування вихідної спорової культури			Нержавіюча сталь марки 316L
К-2		Колба (качалочна) для рідкофазного культивування вегетативного посівного матеріалу об'єм-0,5л			Нержавіюча сталь марки 316L
К-3		Колба для рідкофазного культивування вегетативного посівного матеріалу 2,5л			Нержавіюча сталь марки 316L
Фе-1	ВЕЕ	Посівний ферментер об'єм 63 м3 з нижнім зливом та трубою передавлювання. З еліптичними кришками та днищем, з суцільною сорочкою, коефіцієнт заповнення до 0,5 від номінального об'єму, завантаження по трубопроводу або вручну через люк. Перемішування за рахунок механічної турбінної мішалки, суцільна пароводяна сорочка			Нержавіюча кислотостійка сталь марки AISI430
Ф-2	ФТО-60	Індивідуальний фільтр стерилізації (тонкої очистки) повітря. Продуктивність 98			
			ЕКБ.БЕ6127.ДП		
Змн.	Арк.	№ докум.	Підпис	Дата	
Розроб.	Демків А.Р.				
Керів.	Левтун І.І.		ДОДАТКИ		131
Затверд.					132
			КПІ ім. Ігоря Сікорського, ФБТ		

		м3/год, швидкість руху			
		повітря - 0,05м/с, площа поверхні фільтрування 1м2, гідравлічний опір потоку повітря - 600 Па, коефіцієнт проскоку - 0,001. Фільтруючий матеріал - гофровані елементи з тканини Петрянова			
K-16		Вакуум-апарат з циліндричного корпусу з еліптичною кришкою і днищем, з теплоізолюючою паровою сорочкою та змішуючим пристроєм.			Внутрішня поверхня апарату виготовлена з харчової нержавіючої сталі. Зовнішня – нержавіюча 316L
C-17		Розпилююча сушарка з теплоізолюючою паровою сорочкою.			Внутрішня поверхня апарату виготовлена з харчової нержавіючої сталі. Зовнішня – нержавіюча 316L
PIS		Манометр електроконтактний			ДМ Сг 05 100
TE		Термостат			TER-3A
LSA		Датчик рівня			WLC-02
FQSI		Витратомір			1-6" WFS-6000
QE		РН-метр			Adwa AD100
MI		Прилад контролю вологості			MTR-732A